

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Matěj Röder

Dynamika plasmatické membrány a tonoplastu při zavírání a otevírání průduchů
Cytoplasmic membrane and tonoplast dynamics during closing and opening of stomata

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Viktor Žárský, CSc.

Praha, 2013

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému školiteli RNDr. Viktoru Žárskému CSc. za pomoc a výběr tématu a konzultantovi Mgr. Ivanu Kulichovi za cenné rady.

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 5. 2013

Podpis

Obsah:

1. Úvod.....	5
2. Turgor	6
2.1 Obecný vliv turgoru na tvar a objem buňky	6
2.2 Jak buňka ovlivňuje turgor	7
3. Dynamika cytoplazmatické membrány svěracích buněk.....	9
3.1 Dynamika cytoplazmatické membrány protoplastu svěracích buněk.....	9
3.1.1 Dynamika draselného kanálu KAT1	11
3.1.2 Metoda terčíkového zámku	12
3.2 Struktura cytoplazmatické membrány a tonoplastu u intaktních buněk.....	12
3.2.1 Struktura cytoplazmatické membrány a tonoplastu svěrací buňky v otevřeném průduchu pozorovaná TEM.....	13
3.2.2 Struktura cytoplazmatické membrány a tonoplastu svěrací buňky v průduchu zavřeném přirozeným cirkadiánním rytmem pozorovaná TEM	13
3.2.3 Struktura cytoplazmatické membrány a tonoplastu svěrací buňky v průduchu zavřeném CO ₂ pozorovaná TEM	15
3.2.4 Osmiofilní tělíska	16
3.3 Dynamika cytoplazmatické membrány u intaktních buněk.....	17
4. Vakuola a tonoplast svěracích buněk.....	18
4.1 Vakuolární dynamika svěracích buněk průduchů při otevírání a zavírání	18
4.2 Vnitřní struktura vakuol.....	19
4.2.1 Propojení vakuolárního komplexu	21
4.2.2 Korelace fúze vakuol s otevíráním průduchů.....	21
5. Propojení membránových systémů svěracích buněk při otevírání a zavírání průduchů	23
5.1 Propojení vakuoly a cytoplazmatické membrány.....	23
5.2 Endosomální komponenty	24
6. SNARE proteiny	26
6.1 Propojení SNARE s transportem iontů.....	26
6.2 Dynamika SNARE.....	28
7. Vliv cytoskeletu na funkci svěracích buněk.....	29
7.1 Dynamika aktinového cytoskeletu a jeho vliv na funkci svěracích buněk	29
7.1.1 Vliv přestavby aktinu na dynamiku svěrací buňky	30
7.1.2 Vliv přestavby mikrotubulů na dynamiku svěrací buňky	31
8. Závěr.....	32
Seznam použité literatury	33

Abstrakt:

Průduchy jsou struktury v pokožce rostlin zajišťující svou průduchovou štěrbinou regulovaný kontakt apoplastického prostoru rostliny s okolím. Zásadní úlohu pro zahájení otevření či zavření průduchu hraje změna turgoru ve svěracích buňkách. Během stomatálních pohybů prodělává svěrací buňka značné a opakované změny svého objemu, a tedy i povrchu, v rámci minut. Protože cytoplazmatická membrána má pouze malou roztažitelnost, tak tato změna musí být doprovázena i změnou povrchu membrány. Ta se může dít pomocí membránových vchlípenin a endocytózy membránových váčků. Pomocí elektrofyziologických a mikroskopických technik bylo dokázáno, že oba procesy se ve svěracích buňkách reálně dějí. Tyto procesy jsou ovládány a regulovány komplexní sítí signálních drah, v nichž důležitou roli hraje aktinový i mikrotubulární cytoskelet, proteiny z nadrodiny SNARE, iontové kanály a další molekuly.

Cílem této práce je sumarizovat současné znalosti o procesech a mechanismech těchto změn membránových povrchů a jejich molekulovou podstatu.

Klíčová slova: endocytóza, membránové vchlípeniny, turgor, svěrací buňky, cytoplazmatická membrána, tonoplast, cytoskelet, SNARE

Abstract:

Stomata are epidermal structures mediating regulated contact of plant apoplast with surrounding environment via stomatal opening. Change of turgor plays crucial part in initiation of stomatal opening or closure. During stomatal movement, guard cell undergo considerable and repetitive changes in cell volume and consequently surface area over a period of minutes. Alteration in the surface of membrane must occurs due to limited stretching capability of the plasma membrane. It can be achieved through membrane invaginations and endocytosis of small vesicles. Microscopy and electrophysiology techniques have proven that both processes are happening in guard cells. These processes are controlled and managed by complex web of signal pathways in which actin and microtubular cytoskeletons, SNARE proteins, ion channels and others molecules have crucial parts.

The aim of this work is to summarize current knowledge on the processes and mechanisms of these membranes surface changes and their molecular principle.

Key words: endocytosis, membrane invaginations, turgor, guard cell, cytoplasmic membrane, tonoplast, cytoskeleton, SNARE

Seznam použitých zkratek

ABA	– kyselina abscisová
AO	– auramin O
BDM	– 2,3-Butandion-monoxim
CLSM	– konfokální laserová skenovací mikroskopie
CM	– cytoplazmatická membrána
Cm	– elektrická kapacita membrány
ER	– endoplazmatické retikulum
FDA	– fluorescein diacetát
$f_{FM,I}$	– intenzita fluorescenčního signálu vycházející z nitra buňky
$f_{FM,p}$	– intenzita fluorescenčního signálu plazmatické membrány
$f_{FM,t}$	– intenzita fluorescenčního signálu celé buňky
LIPS	– Live Images of Plant Stomata
MVB	– multivezikulární tělíska
P_e	– turgorový tlak v epidermálních buňkách
P_g	– turgorový tlak ve svěracích buňkách
TEM	– transmisní elektronová mikroskopie
TVM	– transvakuolární membrány
V_g	– Objem svěrací buňky
SEM	– skenovací elektronová mikroskopie

1 Úvod

Průduchy jsou struktury v pokožce rostlin skládající se ze dvou specializovaných epidermálních buněk, nazývaných svěrací buňky, průduchové štěrby, která se nachází mezi těmito dvěma buňkami, a 2-6 podpůrnými buňkami nalézajícími se v přímém sousedství svěracích buněk. Funkcí průduchů je zprostředkovávat kontakt mezi atmosférou a apoplastickým prostorem rostliny, čímž umožňují regulovat odpar vody a příjem CO₂. Jsou tedy zodpovědné za klíčové pochody, jako je fotosyntéza a transpirace, a jsou ve středu zájmu mnoha vědeckých skupin jako model pro studium přenosu signálů v rostlinách (Schroeder *et al.*, 2001).

Svěrací buňky jsou schopny vnímat mnoho vnějších i vnitřních signálů a odpovídat tak na vlivy prostředí změnou svého turgoru, jenž je klíčový pro otevírání a zavírání průduchů (Roelfsema a Hedrich, 2005; Pandey *et al.*, 2007; Shimazaki *et al.* 2007). Základem pro tento pohyb je tvarová změna svěrací buňky při změně turgoru. Příčinou této změny je jedinečná struktura buněčné stěny svěrací buňky, avšak podílejí se na něm také intenzivně vakuola, tonoplast, cytoskelet i endosomální systémy (Roelfsema a Hedrich 2005; Tanaka *et al.*, 2007; Galatis a Apostolakos 2004). Svěrací buňky neobsahují plazmodesmy, cytoplazmatická membrána tedy hraje klíčovou úlohu v přenosu veškerých látek a signálů mezi průduchem a okolím (Wille a Lucas 1984).

Svěrací buňka při procesu otevírání a zavírání průduchů mění svůj objem až o 300 % (Blatt *et al.*, 1999), povrch až o 40 % (Raschke, 1979) a turgor se pohybuje mezi 1 až 5 MPa (Franks *et al.*, 1998; Franks *et al.*, 2001), v důsledku čehož musí docházet k přesnému vyvážení transportu iontů a membránového materiálu v buňce, zejména cytoplazmatické membrány (CM) a tonoplastu, jelikož roztažitelnost membrán je pouze kolem 3 % a vakuola zabírá až 90 % objemu buňky (Wolfe a Steponkus 1983; Wolfe *et al.*, 1986; Olbrich *et al.*, 2000).

Existují dvě hlavní hypotézy, které se snaží vysvětlit osud přebývajícího povrchu membrány při zavírání průduchu a *vice versa*. Jedna se tento rozdíl snaží vysvětlit pomocí endocytózy a exocytózy membránových váčků, zatímco druhá je založena na principu membránových vychlípenin.

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky zabývající se změnou struktury a pohybem membrán svěracích buněk během otevírání a zavírání průduchů, jak jsou regulovány na molekulární úrovni a co tyto jevy ovlivňuje.

2 Turgor

Turgor je tlak, který tlačí CM proti buněčné stěně. Vzniká v důsledku rozdílných osmotických prostředí mimo a uvnitř prostoru ohraničeného semipermeabilní membránou. Pokud je v buňce nižší (zápornější) vodní potenciál než v jejím okolí, tak tento rozdíl se projevuje v tlaku CM na buněčnou stěnu. Turgor je důležitý pro funkci a růst všech rostlinných buněk a udržuje rigiditu rostlinného těla (Turner a Jones, 1980).

Jak již bylo v úvodu řečeno, svěrací buňky pracují s velmi velkým rozsahem turgoru, který se může za normálních podmínek pohybovat mezi 1 až 5 MPa (Franks *et al.*, 1998; Franks *et al.*, 2001). Vytvoření a udržení tak vysokého turgoru je možná pouze tím, že svěrací buňka není spojena s okolními buňkami plazmodezmy, kterými by tlak unikl do okolních buněk (Wille a Lucas, 1984).

2.1 Obecný vliv turgoru na tvar a objem buňky

Velikost průduchové štěrby je závislá na turgoru svěracích buněk (P_g) a okolních epidermálních buněk (P_e). Zjednodušeně lze říct, že zvýšení P_g/P_e vede k rozšíření póru a snížení P_g/P_e vede k jeho uzavírání (Franks *et al.*, 1998). Epidermální buňky mají nad svěracími buňkami mechanickou převahu, neboť při stejném zvýšení turgoru v obou dojde k uzavírání průduchu (Glinka 1971; Edwards *et al.*, 1976; Franks *et al.*, 1998).

Změna hodnoty osmotického tlaku je hlavní způsob, jakým rostliny ovlivňují otevřenost svých průduchů, i když spouštěcí mechanismus této změny se může různit (Bearce a Kohl, 1970; Humble a Raschke, 1971; MacRobbie, 1980). U většiny druhů dochází pouze k řízené změně osmotického tlaku svěracích buněk, zatímco u okolních buněk zůstává relativně konstantní (Shackel, 1987; Nonami *et al.*, 1990). Avšak u mnoha druhů trav dochází i ke změně osmotického tlaku u okolních epidermálních buněk a to opačným směrem než u svěracích (Raschke a Fellows, 1971).

Pro analýzu a matematický popis mechanických modelů svěracích buněk je nejlépe popisovat je jako tenkostěnné objekty naplněné kapalinou, nikoli jako homogenní pevný předmět. Tyto objekty nejlépe popisuje teorie kaučukové elasticity polymerů (theory of rubber/polymer elasticity). Jiné modely, beroucí například v potaz modul pružnosti v tahu ve vztahu k stlačitelnosti tělesa, jsou pro popis dynamiky závislosti tlaku na objemu nevhodné a modely takto vytvořené jsou velmi zkreslené (Wu *et al.*, 1985). Pro model je navíc nezbytný přesný popis uložení celulóznic fibril, které mají radiální uspořádání, kdy největší koncentraci fibril a tedy i pevnost má strana směřující do svěrací štěrby a nejnižší

koncentraci má strana opačná, směřující k sousedním epidermálním buňkám (Willie a Lucas, 1984).

Křivka závislosti objemu na tlaku u svěracích buněk má sigmoidní průběh (Raschke and Dickerson 1972). Podle matematického modelu popsaného výše jsou při rozpínání svěracích buněk rozpoznatelné 2 fáze. V první fázi, při nízkém tlaku, probíhá izotropní roztahení a buněčná stěna se natahuje zhruba rovnoměrně podélně i tangenciálně. Křivka závislosti V_g (objem svěracích buněk) na P_g (turgorový tlak ve svěracích buňkách) je pozitivně zakřivena. V druhé fázi, při větším tlaku a objemu, se buňka roztahuje anizotropicky, neboť radiální ztlustění buněčné stěny již dosáhlo limitu své elasticity a většina roztahování se děje v podélném směru. Závislost V_g na P_g je negativně zakřivena (Sharpe *et al.*, 1987). Tento jev je způsoben unikátním uspořádáním celulóзовých vláken v buněčné stěně (Palevitz a Helper, 1976; Helper 1981).

Je jasné, že rozpínání buněčné stěny musí být kopírováno i změnou v povrchu plazmatické membrány. Tato změna se musí dít za pomoci přidávání membrány, tedy exocytózy, neboť její roztaznost je pouze kolem 3 % (Wolfe a Steponkus 1983; Olbrich *et al.*, 2000).

2.2 Jak buňka ovlivňuje turgor

Hlavní úlohu při regulované změně turgoru ve svěracích buňkách při otevírání a uzavírání průduchů hrají kationty K^+ a doprovodné anionty jako malát a Cl^- , v závislosti na podmínkách. Hodnoty K^+ ve *Vicia faba* (Bob obecný) se mohou měnit až v rozmezí 2-4 pmol na buňku, což je změna o 200-300 mOsM v závislosti na objemu buňky. Tato změna probíhá v rozmezí 30 minut při zavírání a 2-3 hodin při otevírání. Z toho vyplývá, že svěrací buňky mají vyšší transportní kapacitu pro tyto ionty, než většina rostlinných buněk (shrnuto v Blatt, 2000).

Za hlavní kanály zodpovídající za vtok K^+ iontů cytoplazmatickou membránou během otevírání průduchu byly v mnoha rostlinných druzích identifikovány draselné kanály z podrodiny TC 1.A.1.4. Jedná se zejména o kanály KAT1 (Nakamura *et al.*, 1995), KAT2 (Pilot *et al.*, 2001) a AKT1 (Szyroki *et al.*, 2000), v menší míře i kanál AKT2/3 (Szyroki *et al.*, 2000). Hlavní kanál odpovědný za výtok K^+ iontů z buňky je homolog proteinu SKOR, GORK, vyskytující se právě ve svěracích buňkách (Hosy *et al.* 2003).

Vzhledem k tomu, že vakuola zabírá až 80 - 90 % buňky, většina osmoticky aktivních solutů, které projdou CM, musí projít i tonoplastem (MacRobbie, 1995; MacRobbie, 1999).

Transport K^+ iontů přes tonoplast zajišťuje rodina TPK kanálů, která hraje klíčovou roli v jeho cytoplazmové homeostázi (Gobert *et al.*, 2007; Isayenkov *et al.*, 2010).

Velmi významnou úlohu hrají i další osmoticky aktivní látky jako například sacharóza a produkty hydrolýzy škrobu, zejména při 2., večerní, polovině denního cyklu (Talbott a Zeiger, 1993; Talbott a Zeiger, 1997).

3. Dynamika cytoplazmatické membrány svěracích buněk

Jak již bylo psáno v úvodu, existují dvě hlavní vzájemně se nevylučující hypotézy vysvětlující osud přebytečné (při zavírání) a původ chybějící (při otevírání) cytoplazmatické membrány u svěracích buněk v zavírajících se, respektive otevírajících se průduších.

První se tento rozdíl snaží vysvětlit pomocí endocytózy a exocytózy membránových váčků. Proti této teorii zdánlivě stojí energetická náročnost endocytózy, která musí překonávat velký turgorový tlak. Při výpočtu nezbytné energie je třeba vzít v úvahu dva faktory. Energii potřebnou pro endocytózu proti hydrostatickému tlaku a pro překonání bariéry Gibbsovy volné energie proti vytvoření membránového váčku, které se dohromady zdají být příliš velkou zátěží pro metabolismus buňky (Cram, 1980). Při důkladném prozkoumání se však ukázalo, že váčky, které se při endocytóze tvoří, jsou dostatečně malé, takže bariéra Gibbsovy energie je velmi malá a udržování silné endocytózy je plně v metabolických kapacitách buňky (Saxton a Breidenbach, 1988). Druhá hypotéza je založena na principu změny tvaru buňky a tvorby vchlípenin, do kterých by se CM a tonoplast složily. Tato operace je sice energeticky méně náročná, neboť nevyžaduje endocytózu a následnou fúzi váčků, ale vchlipování membrány se stále děje proti silnému turgoru a je třeba robustního proteinového lešení pro udržení membránových extruzí (Gordon-Kamm a Steponkus, 1984).

3.1 Dynamika cytoplasmatické membrány protoplastu svěracích buněk

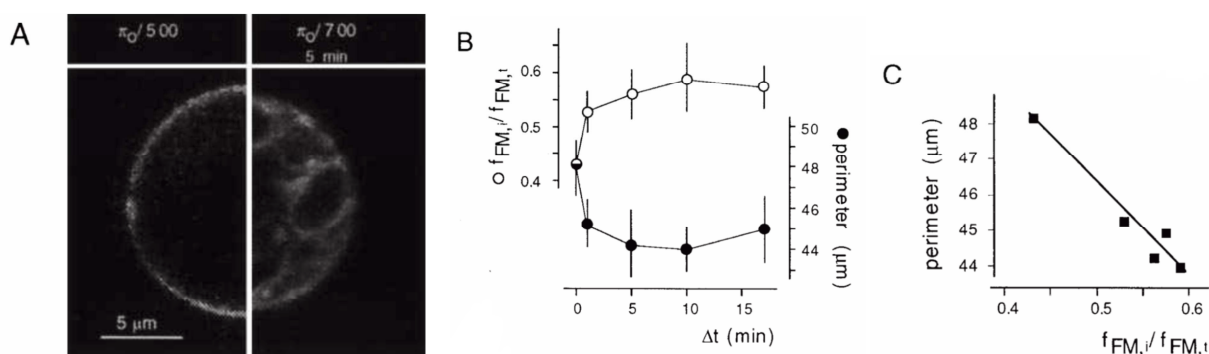
Pro pozorování pohybu CM *in vivo* je klíčové pozorování u protoplastů, neboť zde odpadá problém se silnou buněčnou stěnou svěracích buněk, která velmi znesnadňuje přesnou vizualizaci a neumožňuje použití metody přímého měření terčíkového zámku. Protoplasty jsou buňky zbavené buněčné stěny. K zbavení buněk buněčné stěny se používá roztok enzymů trávící pouze tuto buněčnou stěnu, jako jsou celulázy, pektinázy a xylanázy (Butenko, 1979).

U protoplastů je turgor prakticky nulový, neboť zde není žádná pevná bariéra v podobě buněčné stěny, proti které by plazmatická membrána tlačila, avšak princip vnímání vnitřního pnutí v plazmatické membráně, který je generován změnou osmotického tlaku, zůstává stejný, a proto by mechanismy podílející se na dynamice expanze či zmenšování povrchu cytoplazmatické membrány měly zůstat stejné (Diekmann *et al.*, 1993).

První důkaz o internalizaci cytoplazmatické membrány u protoplastů svěracích buněk přinesl experiment, při kterém byla předem barevně označena vakuola pomocí barvy Neutral Red (Neutrální červeně) a extracelulární prostor byl obarven barvami Lucifer Yellow-CH a

Cascade Blue. Tento experiment prokázal, že při osmotickém smrsknutí protoplastu svěrací buňky dojde k internalizaci CM pomocí váčků a s ní jsou pohlceny i barvy, použité pro obarvení extracelulárních prostor. Pokud bylo použito následně více barev, tyto barvy se nesmísily, což nasvědčuje tomu, že nedochází k fúzi těchto váčků uvnitř buňky. Navíc se ukázalo, že při následné aplikaci hypoosmotického stresu a expanzi protoplastu do jeho původní velikosti pravděpodobně nedošlo k návratu všech těchto váčků do CM, ale částečně zůstaly v cytoplasmatickém prostoru, neboť se neztratila jejich barevnost. Osud těchto váčků se již nepodařilo dále sledovat, neboť barva z nich po čase prosákla do okolí (Diekmann *et al.*, 1993). Tomuto prosáknutí nezabránila ani aplikace probenecidu v koncentraci 50 mmol m^{-3} , což je největší přípustná koncentrace, aniž by vznikly patologické změny v protoplastových strukturách. Probenecid je látka kompetitivně inhibující funkci membránových transportérů organických aniontů i kationtů (Hsiu *et al.* 1988).

Další experiment na protoplastech, kdy byla zkombinována metoda terčíkového zámku a CLSM (konfokální laserová skenovací mikroskopie) pro zkoumání endocytózy protoplastů svěracích buněk *Vicia faba* publikovali Kubitschek *et al.* v roce 2000. Využili specifické fluorescenční membránové sondy FM1-43, která je ve vodném roztoku prakticky nefluoreskující a fluorescence je stimulována vazbou na membránu. Při tomto pokusu nejprve nechali buňky v $500 \text{ mOsmol kg}^{-1}$ prostředí a následně zvýšili osmolaritu okolí na $700 \text{ mOsmol kg}^{-1}$. Protoplasty se po 5 minutách zmenšily ve svém průměru o 7,9 % a objevila se masivní internalizace fluorescence, která byla 135 krát vyšší než internalizace při stabilním osmotickém prostředí. Po 15 minutách byla vnitřní fluorescence o 1,6 krát vyšší než fluorescence v kontrolních buňkách, které byly ponechány ve stabilním osmotickém prostředí.



Obrázek 1: Zmenšení povrchu a distribuce FM1-43 označených membrán u protoplastů svěracích buněk *Vicia faba* po zvýšení osmotického tlaku. (A) snímek ekvatoriální roviny půlky protoplastu z CLSM 20 minut inkubace s $10 \mu\text{M}$ FM1-43 za stálého osmotického tlaku $500 \text{ mosmol kg}^{-1}$ a stejná půlka protoplastu (zrcadlově obrácená) 5 minut po zvýšení tlaku na $700 \text{ mosmol kg}^{-1}$. (B) průběh internalizace FM1-43 a kontrakce buňky v čase. (C) závislost obvodu a internalizace fluorescence při smršťování protoplastu

Během pokusu bylo pozorováno i několik endocytotických kompartmentů dostatečně velkých pro přímé rozlišení CLSM. Navíc $f_{FM,i}/f_{FM,t}$ ($f_{FM,i}$ je intenzita fluorescenčního signálu vycházející z nitra buňky; $f_{FM,t}$ je intenzita fluorescenčního signálu celé buňky) vykazovalo přímou závislost k průměru buňky. Elektrická kapacita cytoplazmatické membrány buňky odpovídala pohybům fluorescence. CM se chová jako kondenzátor a na svém povrchu nese elektrický náboj. Velikost tohoto náboje odpovídá velikosti povrchu a měří se metodou terčíkového zámku v celobuňkovém uspořádání viz kapitola 3.1.2. Když byla buňka v hypoosmotickém prostředí, povrch buňky se zvětšoval s odpovídajícím přírůstkem C_m (elektrická kapacita membrány) i $f_{FM,p}$ (fluorescence membrány), což nasvědčovalo tomu, že docházelo k exocytóze FM1-43 neoznačených váčků. Pokud byla buňka vystavena hyperosmotickému prostředí, docházelo k snižování C_m a $f_{FM,p}$ zůstávalo konstantní. Tonoplast při tomto experimentu nevykazoval zvýšení fluorescence, což nasvědčuje tomu, že endocytotické váčky nesplývají s vakuolou. V asi 1 μm vzdálenosti od CM se ovšem začal vyskytovat fluorescenční endosomální pás, jehož strukturu však nešlo přesně určit, neboť se velikostně pohybuje pod rozlišovací schopností konfokálního mikroskopu. Nicméně to ukazuje na to, že přebytečná membrána v podobě endocytických váčků se ukládá v prostoru cytoplazmy blízko CM. Tyto výsledky přinášejí nepopíratelné důkazy podporující endocytickou teorii (Kubitschek *et al.*, 2000). Na druhou stranu však snímky smrštěných protoplastů *Vicia faba* z SEM (skenovací elektronová mikroskopie) ukazují exocytické extruze na plazmatické membráně, které však nejsou vidět na protoplastech nabobtnalých, což nasvědčuje tomu, že tyto extruze se podílí na dynamických změnách povrchu CM svěřacích buněk (Lambrechts *et al.*, 1992).

3.1.1 Dynamika draselného kanálu KAT1

Při zavírání průduchů *Vicia faba*, indukovaných osmotickým tlakem, dochází k internalizaci fluorescenčních KAT1::GFP kanálů ve svěřacích buňkách. Fluorescence internalizovaných membránových váčků byla silnější než okolní CM, což svědčí pro cílené specifické vychytávání těchto kanálů (Hurst *et al.*, 2004). Stejně tak, i při ABA (kyselina abscisová) indukovaném zavírání průduchů *Arabidopsis thaliana* (Huseníček rolní) dochází k selektivní internalizaci KAT1 do endozomálních kompartmentů, které nejsou součástí lytických endozomů ani Golgiho aparátu, ale jedná se o do té doby necharakterizovaný kompartment. KAT1 jsou z tohoto kompartmentu následně v řádu hodin po vymytí ABA navraceny do cytoplazmatické membrány (Sutter *et al.*, 2007). Jedná se tedy o důkaz, že endocytické váčky nemají náhodné složení membrány. Je však otázka, proč k tomuto jevu

dochází, protože je prokázáno, že KAT1 kanál je ve svěracích buňkách pro otevření a zavření průduchů nepodstatný a buňky s defektním KAT1 mají jen velmi málo zpomalené stomatální pohyby (Szyroki *et al.*, 2001).

3.1.2 Metoda terčíkového zámku

Jednou z nejdůležitějších metod pro zkoumání cytoplazmatické membrány u protoplastů svěracích buněk je metoda měření terčíkového zámku, konkrétně snímání z celé buňky (whole-cell patch clamp), kdy se za pomoci speciální mikropipetové elektrody připojené přímo na buňku měří elektrická kapacita membrány buňky jako kapacita kondenzátoru, která je závislá na povrchu membrány. Tuto metodu vyvinuli a zdokonalili Erwin Neher a Bert Sakmann na konci 70. a začátku 80. let a obdrželi za ni Nobelovu cenu v roce 1993. U rostlinných protoplastů bylo několikrát prokázáno, že platí lineární závislost mezi kapacitou a povrchem buňky a byla vypočítána specifická kapacita mezi 7,5 až 8,1 mF m⁻² (Zorec a Tester, 1992; Thiel *et al.*, 1994; Homann, 1998). Tato metoda umožňuje velmi přesné měření povrchu buňky a dokáže přesně detekovat exocytózu a endocytózu membránových váčku o průměru až 60 nm v intervalech blížících se 10 ms (Neher a Marty, 1982; Kreft a Zorec 1997). Výhodou tohoto měření je, že v konfiguraci měření z celé buňky, je cytoplasma dialyzováno roztokem z mikropipety, což umožňuje výbornou regulaci obsahu cytoplazmy, stejně tak jako vpravení regulátorů exocytózy a endocytózy.

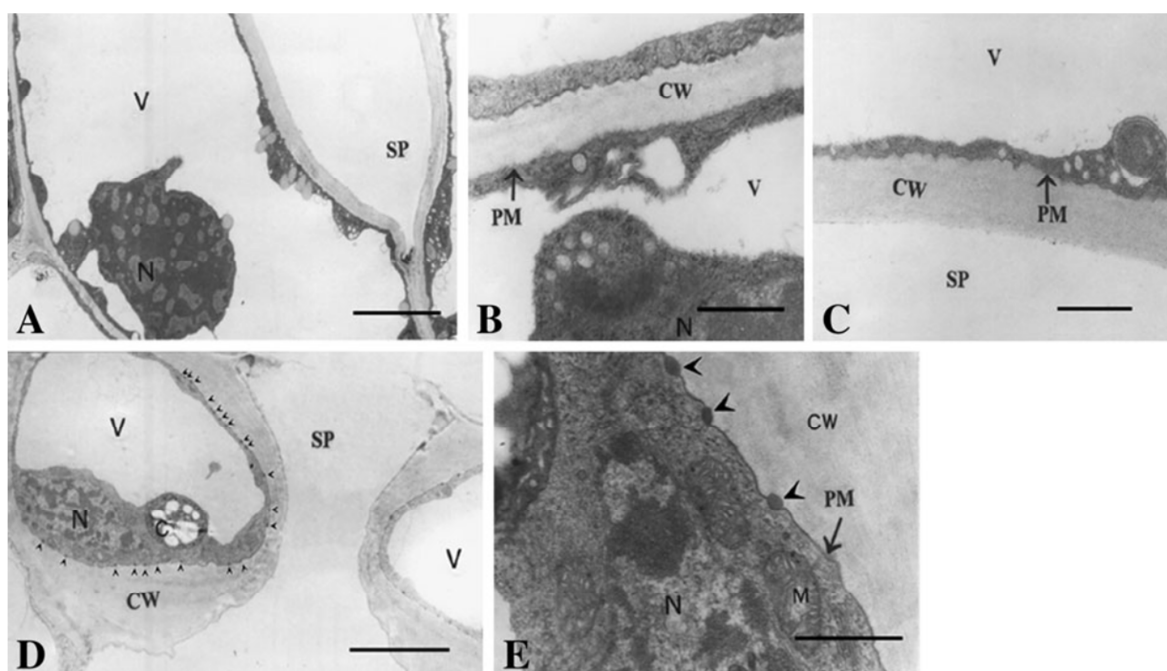
Velkou nevýhodou tohoto měření však je jeho použitelnost pouze u protoplastů, kdy chybí vazba CM na buněčnou stěnu, která se ukázala být velmi důležitým faktorem pro pohyb CM při stomatálních pohybech (Li *et al.*, 2010).

3.2 Struktura cytoplazmatické membrány a tonoplastu u intaktních buněk

V posledních letech se začalo upouštět od pokusů na protoplastech a přešlo se na pokusy se sloupnutou epidermis a s rozvojem CLSM i na větší listové řezy. Tyto pokusy, byť na ně nelze použít metodu terčíkového zámku, lépe odpovídají skutečnosti, neboť zde dochází k interakci CM s buněčnou stěnou i vzájemnou interakcí mezi buňkami epidermis.

3.2.1 Struktura cytoplazmatické membrány a tonoplastu svěrací buňky v otevřeném průduchu pozorovaná TEM

Většinu objemu buňky v otevřeném průduchu zabírá jedna velká centrální vakuola, která tlačí cytoplazmu ve většině svého objemu těsně na buněčnou stěnu. V TEM (transmisní elektronová mikroskopie) se i při velkém zvětšení jeví CM i tonoplast hladké a bez záhybů (endocytických i exocytických). Na příčném průřezu jsou na rozhraní buněčné stěny a CM pozorována osmiofilní tělíska, nacházející se na horní, dolní a ventrální oblasti buňky, ale nejsou viditelná na straně dorzální, což nasvědčuje jejich specifickému umístění na povrchových doménách buňky (Li *et al.*, 2010).



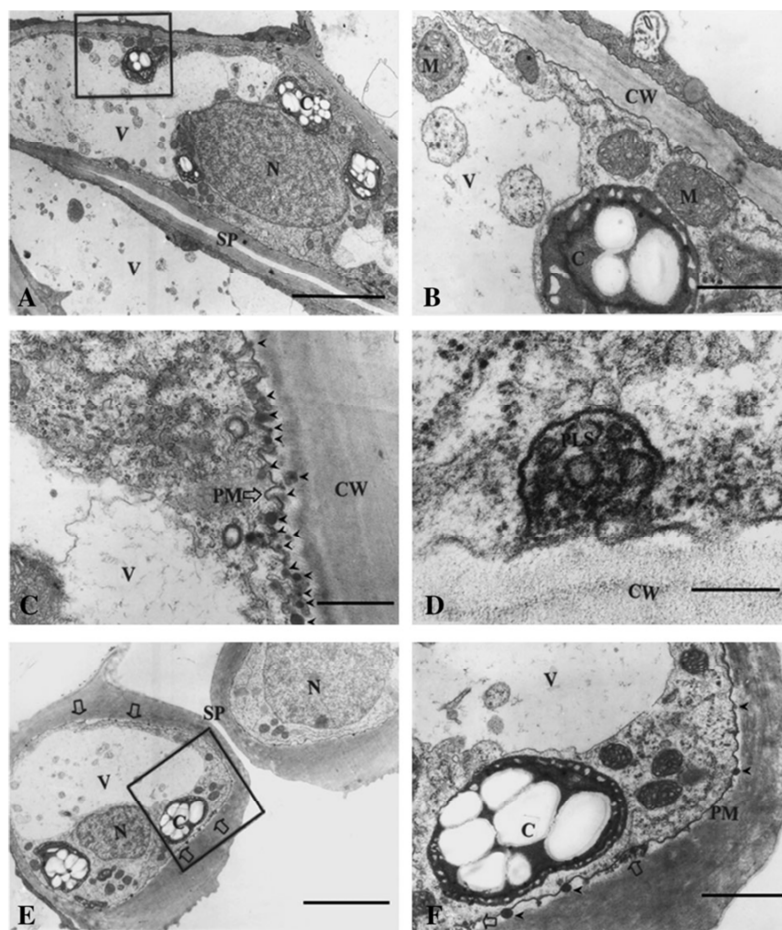
Obrázek 2: Obraz průřezu svěrací buňky otevřeného průduchu z TEM. (A) Podélný průřez. Úsečka = 3 μm . (B) Podélný průřez na dorzální straně. Šipka ukazuje plazmatickou membránu. Úsečka = 0,5 μm . (C) Podélný průřez na ventrální straně. Šipka ukazuje plazmatickou membránu. Úsečka = 0,5 μm . (D) Příčný průřez. Hroty ukazují osmiofilní tělíska. Úsečka = 4 μm . (E) Příčný průřez na ventrální straně. Šipka ukazuje plazmatickou membránu. Hroty ukazují osmiofilní tělíska. Úsečka = 0,1 μm .
V – vakuola; N – jádro; SP – průduchová štěrбина; CW – buněčná stěna; PM – Cytoplazmatická membrána; M – mitochondrie
Převzato z Li *et al.* (2010)

3.2.2 Struktura cytoplazmatické membrány a tonoplastu svěrací buňky v průduchu zavřeném přirozeným cirkadiánním rytmem pozorovaná TEM

Zavření průduchů cirkadiánním rytmem je poměrně pomalý proces probíhající několik hodin. Je to nej přirozenější příčina stomatálních pohybů.

CM již není tak těsně přitížena k buněčné stěně. V přední části (část směřující do průduchu) je plazmalema silně zvrásněná. Osmiofilní tělíska jsou podlouhlejší a místy se objevují plazmalemazomy, (cytoplazmatické struktury vzniklé invaginací CM) (Li *et al.*, 2010).

Na TEM řezech byla vidět jedna vakuola, do které byly internalizovány provazce cytoplazmatického materiálu, které se navzájem lišily nejen velikostí, ale i obsahem. Všechny však byly obaleny jednovrstevnou membránou a lze tedy předpokládat, že vznikly endocytózou tonoplastu (Li *et al.*, 2010). Je zde i možnost, že tyto váčky byly součástí tubulárních vakuolárních membrán, které však jsou pravděpodobně zničeny konvenční chemickou fixací (Ashford a Allaway, 2002).



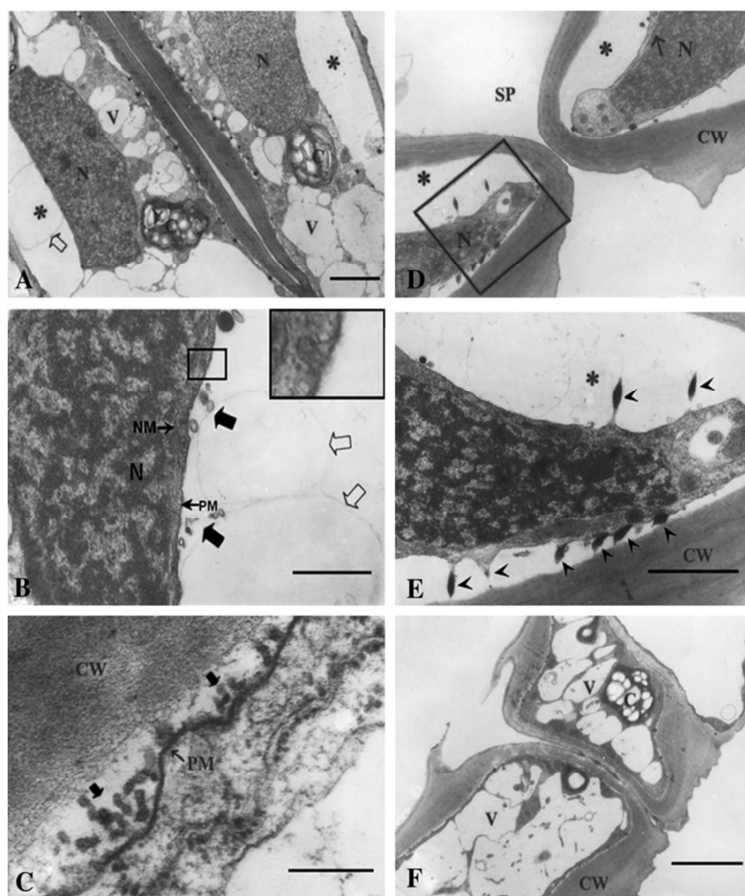
Obrázek 3: Obrázek průřezu svěrací buňky průduchu uzavřeného cirkadiálním rytmem z TEM.

(A) Podélný průřez. Úsečka = 2 μm (B) Zvětšený rámec obrázku A. Podélný průřez. Úsečka = 0,15 μm (C) Podélný průřez na ventrální straně. Šipka ukazuje plazmatickou membránu. Hroty ukazují osmiofilní tělíska. Úsečka = 0,5 μm (D) Velmi zvětšený podélný řez na ventrální straně ukazující plazmalemazom. Úsečka = 0,05 μm (E) Příčný průřez. Šipky ukazují shluky exocytických struktur mimo CM. Úsečka = 2 μm (F) Zvětšený rámec z obrázku E. Příčný průřez. Šipka ukazuje shluk exocytických struktur mimo CM. Hroty ukazují osmiofilní tělíska. Úsečka = 0,25 μm V – vakuola; N – jádro; SP – průduchová štěrбина; CW – buněčná stěna; PM – Cytoplazmatická membrána; PLS – plazmalemazom; M – mitochondrie
Převzato z Li *et al.* (2010)

3.2.3 Struktura cytoplazmatické membrány a tonoplastu svěrací buňky v průduchu zavřeném CO₂ pozorovaná TEM

Zavření průduchů pomocí zvýšené koncentrace CO₂ nebo ABA je, na rozdíl od přirozeného cirkadiálního rytmu, rychlý proces, který může trvat méně než 30 minut při použití vysokých koncentrací těchto látek. Z TEM snímků svěracích buněk rostlin, které byly ponechány ve vysokých koncentracích CO₂, je vidět diametrální rozdíl mezi uspořádáním těchto buněk a svěracích buněk průduchu, který byl uzavřen vlivem cirkadiálního cyklu.

CM byla silně plazmolýzovaná, a to zejména v dorzální oblasti. Naopak na ventrální straně se nikdy silná plazmolýza neobjevila a plazmalema je pevně spojena s buněčnou stěnou. Objevily se exocytické i endocytické částice (Li *et al.*, 2010). Autoři již dále nediskutují tyto exocytické částice, ale svou strukturou jsou podobné exosomům, které vznikají při exocytóze multivezikulárních tělísek (MVB). Mohlo by se však jednat i o kolabovaná hechtova vlákna. Osmiofilní tělíska se protáhla a stále zprostředkovávala kontakt mezi CM a buněčnou stěnou. Vakuola těchto rychle smrsknutých buněk se na pohled jevila fragmentovaná a tonoplast zvrásněný (Li *et al.*, 2010).



Obrázek 4: Obrázek průřezu svěrací buňky průduchu uzavřeného vysokými koncentracemi CO₂ z TEM.

(A) Podélný průřez. Úsečka = 2 μm (B) Zvětšený rámec obrázku A. Podélný průřez ukazující silně plazmolýzovanou oblast. Velké prázdné šipky ukazují velké váčky a velké plné šipky ukazují malé váčky vně CM. Obrázek v pravém horním rohu je zvětšená zarámovaná oblast ukazující endocytózu. Úsečka = 0,25 μm (C) Podélný průřez na ventrální straně ukazující velké množství váčků exocytických struktur. Úsečka = 0,05 μm (D) Příčný průřez. Úsečka = 2 μm (E) Zvětšený rámec z obrázku D. Příčný průřez. Hroty ukazují osmiofilní tělíska. Úsečka = 0,15 μm (F) Příčný průřez v centrální části, kde plazmolýza neprobíhá. Úsečka = 2 μm

V – vakuola; N – jádro; SP – průduchová štěrбина; CW – buněčná stěna; PM – Cytoplazmatická membrána; PLS – plazmalemazom; M – mitochondrie; * – plazmolýzovaná oblast

Převzato z Li *et al.* (2010)

3.2.4 Osmiofilní tělíska

Tato tělíska byla ve svěracích buňkách poprvé pozorována až v roce 2010. Strukturně se podobají lipidovým částicím v cytoplazmě, avšak jsou menší (Li *et al.*, 2010). Nicméně pokusy prokázaly barvitelnost styrylovými barvivy, takže se nemůže jednat o lipidové částice, protože ty jsou těmito barvivy nebarvitelné (Meckel *et al.*, 2004). Vzhledem k intenzitě obarvení za pomoci FM1-43 je pravděpodobné, že tyto osmiofilní tělíska jsou z podobného materiálu jako plazmatická membrána (Li *et al.*, 2010). Tyto tělíska zprostředkovávají spojení CM a buněčné stěny a pravděpodobně budou zapojeny v regulaci procesu plazmolýzy (Li *et al.*, 2010). Li *et al.* jsou doposud jediní, kdo tyto tělíska pozorovali a bližší informace o struktuře a složení těchto tělísek nejsou do dnešního dne známy. Zdá se však, že by se mohlo jednat o Hechtovy provazce, neboť splňují stejnou funkci a také mají složení podobné CM.

3.3 Dynamika cytoplazmatické membrány u intaktních buněk

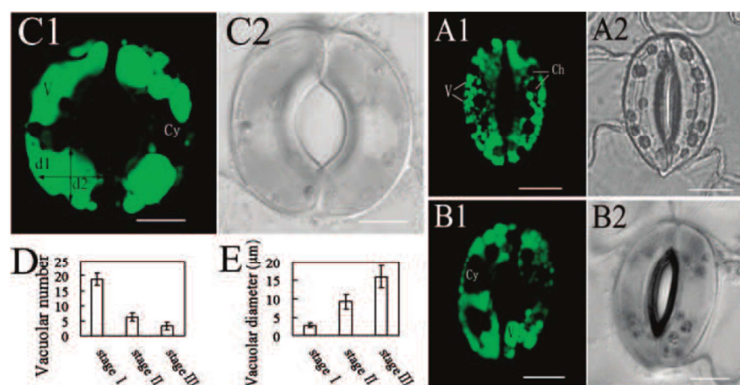
Diekmannův pokus z roku 1993, který prokázal internalizaci extracelulárního barviva Luciferin Yellow-CH u protoplastů svěracích buněk, se nepodařilo zopakovat u intaktních svěracích buněk. Shope proto v roce 2003 provedl podobný pokus, avšak namísto extracelulárního rozpustného barviva použil membránové sondy FM-4-64. Sloupnutou epidermis *Vicia faba* ponořil do vody o osmotickém potenciálu 0MPa. Takto buňky nechal deset minut, aby dosáhly rovnováhy. Následně je nasnímal za pomoci CLSM ve více rovinách, což mu umožnilo zpracování do 3D obrazu. Potom přidal mannitol a celý proces několikrát zopakoval až do vnějšího osmotického tlaku 1,5 MPa, který stále není dostatečný, aby snížil turgor svěracích buněk na 0. Povrch i objem svěracích buněk se v průměru pokusu zmenšil o 40 %, neboť závislost změny povrchu a objemu byla takřka lineární, což je zapříčiněno tvarem a stavbou buněčné stěny svěracích buněk. Délka buňky se zmenšila jen o 10 %, avšak oblouková délka i tloušťka se zmenšily o 40 %. Nutno však podotknout, že buňky okolo svěracích buněk byly mrtvé, což pravděpodobně způsobilo zkreslení objemové i tvarové změny. Fluorescence se uvnitř buňky zvyšovala lineárně s klesajícím povrchem a byla takřka zcela vratná při opětovném zvětšení objemu buňky (Shope *et al.*, 2003).

4. Vakuola a tonoplast svěracích buněk

Vakuola jako největší rostlinná organela, která může zaujímat v plně vyvinutých svěracích buňkách až 90 % buněčného objemu má klíčovou úlohu pro funkčnost průduchů, kdy v průběhu otevírání a zavírání se její objem mění až o 40 % (Fricker a White, 1990; Tanaka *et al.*, 2007) a povrch tonoplastu se mění až o 20 % (Tanaka *et al.*, 2007). Její funkce není čistě mechanická, kdy se podílí na regulaci osmotického toku vody, čímž reguluje změny turgoru, ale i signalizační, neboť vakuola je důležitým zdrojem a úložištěm mimo jiné Ca^{+2} a H^+ iontů, které jsou nezbytné pro sregulaci procesů, které v konečném důsledku vedou ke změně objemu buňky (Blatt, 2000).

4.1 Vakuolární dynamika svěracích buněk průduchů při otevírání a zavírání

Svěrací buňky průduchů *Vicia faba*, které byly před pozorováním v CLSM zavřené pomocí zvýšené koncentrace ABA, obsahovaly mnoho malých vakuol. V průběhu otevírání za pomoci modrého světla z halogenové lampy se počet vakuol ve svěracích buňkách snižoval a naopak jejich průměr se zvyšoval. Autor studie tento průběh uměle rozdělil na 3 fáze za účelem přesnějšího statistického zpracování, a to na základě velikosti průduchové štěrbin, kdy v 1. období byla štěrbina rozevřena méně než 5 μm , v 2. období měla 5 až 8 μm a ve 3. období měla více než 8 μm , a to vždy v nejširším místě. V první fázi obsahovaly svěrací buňky v průměru více než 18 vakuol s průměrem menším než 3 μm . V třetí fázi buňky obsahovaly méně než 4 vakuoly, jejichž průměr byl více než 15 μm . Tyto procesy byly zcela vratné při opětovné aplikaci 10 μM ABA. Obdobných výsledků bylo docíleno i ve svěracích buňkách *Arabidopsis thaliana* (Gao *et al.*, 2005).



Obrázek 5: Vakuoly ve svěracích buňkách

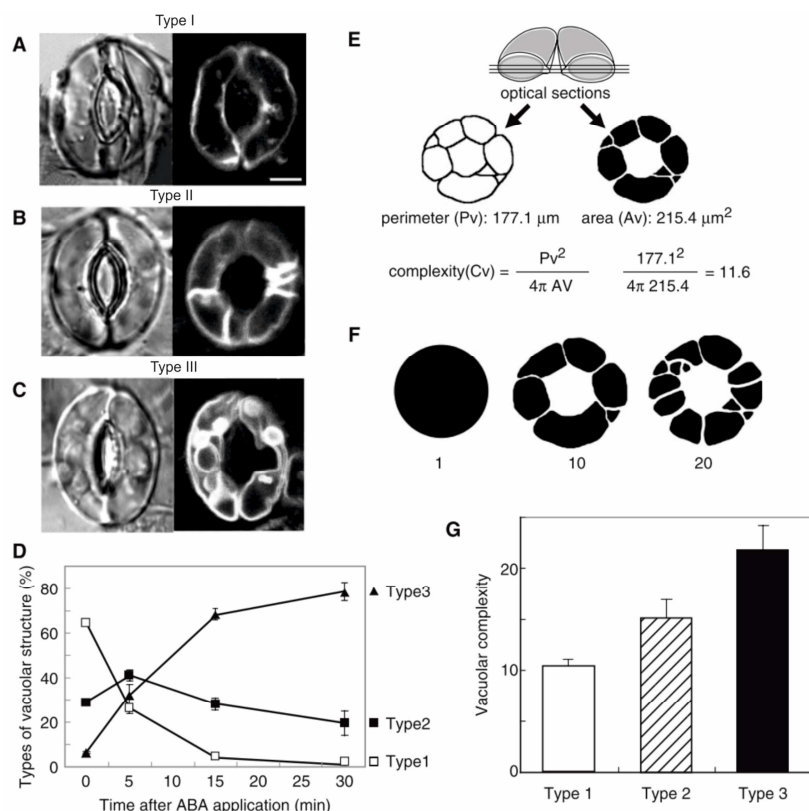
(A) průduch v 1. fázi (průduchová štěrbina má ve svém nejširším místě méně než 5 μm) fluorescenčně obarvený AO (auramin O) (A1) a ve světelném poli (A2); (B) průduch v 2. fázi (průduchová štěrbina má ve svém nejširším místě mezi 5 a 8 μm) fluorescenčně obarvený AO (B1) a ve světelném poli (B2); (C) průduch

v 3. fázi (průduchová štěrbina má ve svém nejširším místě více než 8 μm) fluorescenčně obarvený AO (C1) a ve světelném poli (C2); (D) kvantitativní analýza počtu vakuol v jednotlivých fázích; (E) kvantitativní analýza velikosti vakuol v jednotlivých fázích. Převzato z Gao *et al.* (2005), upraveno

4. 2. Vnitřní struktura vakuol

Ve snímcích svěracích buněk *Vicia faba* z TEM se ukázalo, že vakuoly o průměru do 3 μm byly zpravidla sférické, jejich povrch však nebyl hladký ale zvrásněný. Proti tomu vakuoly o průměru větším než 4 μm měly nepravidelný tvar a velmi často obsahovaly složité membránové struktury ve svém lumen - vrásky tonoplastu (Gao *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010). Tyto záhyby vznikají invaginací tonoplastu a cytoplazmy do prostoru vakuolárního lumen, čímž vznikají specifické vlnité lemy. V lumen mnoha vakuol se nacházely struktury podobné váčkům s průměrem mezi 0,5 a 1,5 μm , které byly obaleny jednoduchou nebo dvojitou membránou. Při podrobném prozkoumání se ukázalo, že tyto struktury mohou pravděpodobně vznikat při spojování tonoplastových záhybů. Vakuoly v ne zcela otevřených průduších vykazovaly TVM (trans vakuolární membrány) o průměru 0,5 až 1,5 μm (Gao *et al.*, 2005). Tyto TVM se však nepodařilo prokázat v TEM, neboť se pravděpodobně zničí působením chemických fixativ (Ashford a Allaway, 2002). Počet všech vnitřních vakuolárních struktur se zmenšoval s postupujícím otevíráním průduchu. Počet váčků ve vakuolách se zmenšil na třetinu a zastoupení vakuol, které obsahovaly váčky, se snížil z 49,3 % na 6,7 % mezi fázemi 1 a 3 (Gao *et al.*, 2005). TVM se ve svěracích buňkách průduchu se svěrací štěrbinou větší než 8 μm vůbec nevyskytovaly. Ze snímků CLSM snímaných v celém průběhu stomatálního pohybu vyplývá, že za tento pokles váčkových struktur a záhybů tonoplastu je odpovědný jejich návrat a fúze do tonoplastu během rozpínání vakuoly. TVM se s postupujícím otevíráním změnily na sférické vakuoly. Tyto procesy byly zcela vratné při opětovném zavření průduchu za pomoci zvýšené koncentrace ABA (Gao *et al.*, 2005).

Pro statistické vyhodnocení byly svěrací buňky rozděleny na tři typy podle toho, jaké vakuolární struktury obsahují. Typ I obsahuje pouze několik luminálních struktur, typ II obsahuje invaginované struktury a typ III obsahuje váčkové struktury v lumen vakuoly. V otevřených průduších bylo okolo 65 % svěracích buněk typu I a typ III se vyskytoval jen zřídka. V začátcích zavírání průduchů se zvětšoval počet buněk II. typu, avšak jak proces pokračoval, začal se počet buněk II. typu také zmenšovat a typ III se stal dominantní se zastoupením okolo 80 % 30 minut po aplikaci ABA. To nasvědčuje tomu, že typ II je pouze přechodným typem mezi jednoduchou a složitou konfigurací v průběhu zavírání průduchu (Tanaka *et al.*, 2007). K ohodnocení poměru tonoplastu vůči vakuolárnímu lumen je používán morfologický parametr vakuolární complexity, jak ji zavedl Tanaka *et al.* (2007).



Obrázek 6: Změny ve vakuolárních strukturách a vyhodnocení vakuolární komplexity. (A-C) Kategorie buněk podle jejich vakuolárních struktur. Nalevo jsou snímky ze světelného mikroskopu, napravo jsou snímky GFP::AtVAM3 z konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Měřítko: 5 μm ; (D) poměr typů svěřacích buněk během zavírání průduchů vyvolaného ABA.; (E) schéma popisující vakuolární komplexitu; (F) příklady vakuolární komplexity; (G) Vakuolární komplexita typů svěřacích buněk
Převzato z Tanaka et al. 2007; upraveno

4.2.1 Propojení vakuolárního komplexu

Při mikroskopickém pozorování svěřacích buněk *Vicia faba* v různých optických úhlech a rovinách bylo objeveno, že některé vakuoly, které se v jedné rovině zdají být oddělené, jsou ve skutečnosti součástí jedné struktury a sdílejí své lumen (Gao *et al.*, 2005). Tato skutečnost byla dále zkoumána při pokusech s řízeným rozkládáním fluoroforu FDA (Fluorescein diacetát), který selektivně barví vakuoly, za pomoci vysoké intenzity excitačního světla (tzv. fotobleaching) bylo zjištěno, že část vakuol v buňce je navzájem spojena a to i na velmi velké vzdálenosti, které se mohou rovnat až délce buňky. Zdá se, že většina vakuol je takto spojena a jejich obsah se může volně mísit (Gao *et al.*, 2005). Podobná studie provedená na buňkách *Arabidopsis thaliana* vykazovala blednutí barviva BCECF-AM v celém objemu svěřací buňky, což by nasvědčovalo tomu, že zde nedochází k žádné fragmentaci vakuoly (Tanaka *et al.*, 2007).

Tyto poznatky jsou ve shodě s teorií „Jedna buňka – jedna vakuola“, kterou poprvé stanovil Reisen *et al.* v roce 2005 na základě 3D mapování BobTIP26-1::gfp (fúzní

proteinový konstrukt tonoplastového akvaporinu) v osmoticky stresované buněčné suspenzi tabáku.

Lze předpokládat, že toto vakuolární spojení na delší vzdálenosti je zajišťováno TVM (Gao *et al.*, 2005), avšak neexistuje pro to žádný přímý důkaz, neboť tyto struktury po chemické fixaci mizí (Ashford a Allaway, 2002).

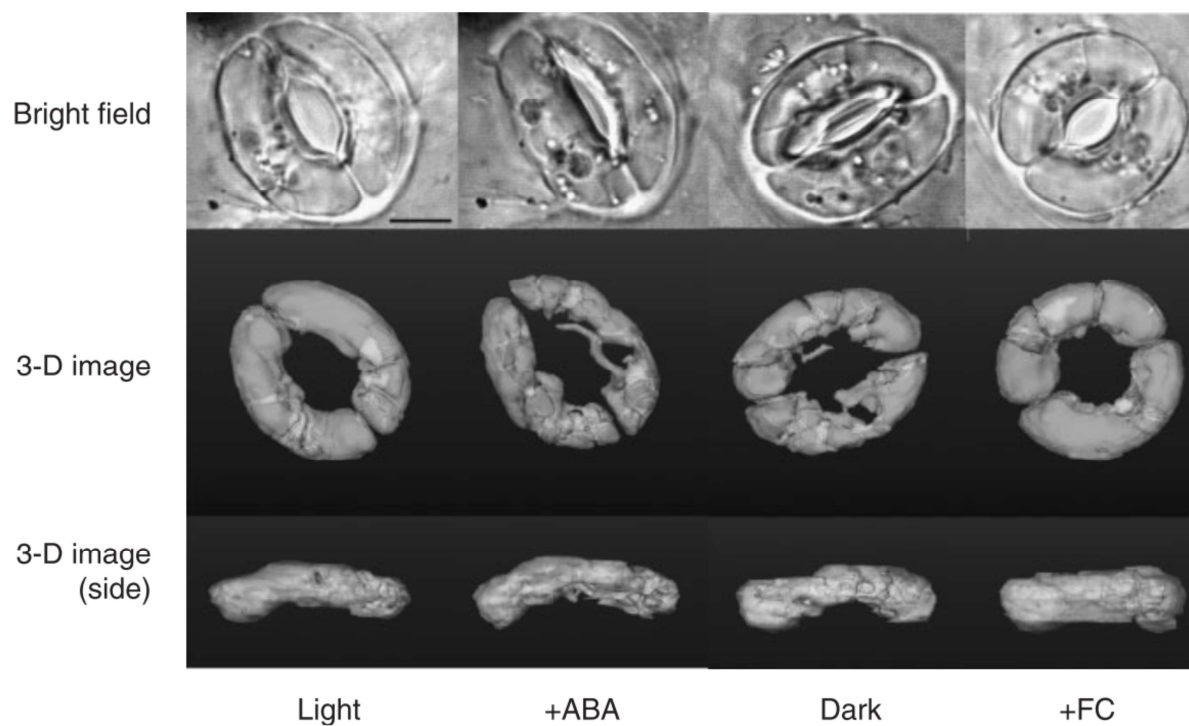
To ovšem neznamená, že by ve svěracích buňkách vůbec nedocházelo k vakuolárním fúzím. Byly zaznamenány menší vakuolám podobné váčky, nespojené s vakuolárním komplexem (Gao *et al.*, 2005, Higaki *et al.*, 2007). Tyto váčky však fúzí s vakuolou velmi brzy po zahájení otevírání průduchu (Gao *et al.*, 2009).

4.2.2 Korelace fúze vakuol s otevíráním průduchů

V minulosti bylo testováno působení několika látek a defektních mutací ovlivňujících fúzi vakuol, konkrétně jejich účinek na dynamiku vakuol a tonoplastu při stomatálních pohybech.

E-64d je volně membránou prostupující inhibitor cysteinových proteáz, který způsobuje akumulaci hladem indukovaných autolyzozomů u kořenových špiček *Hordeum vulgare* (Moriyasu *et al.*, 2003) a akumulaci malých FM4-64 barvitelných váček obklopujících buněčné jádro u buněčných kultur *Nicotiana tabacum* BY-2 v médiu deficientním na sacharidy (Yamada *et al.*, 2003). 2 h působení 100 μ m E-64d na sloupnutou epidermis *Vicia faba* a následná indukce otevření průduchů světlem prokázalo, že fúze vakuol je klíčová pro zvětšení svěracích buněk při procesu otevření průduchů. Rychlost otevření byla výrazně snížena a počet vakuol v těchto buňkách byl vyšší než u kontrolních buněk. 73 % buněk vykazovalo typickou odpověď na E-64d (Gao *et al.*, 2005).

Syntaxin SYP22, také zvaný AtVAM3 a SGR3, hraje klíčovou úlohu v transportu váček a vakuolární fúze (Sato *et al.*, 1997; Sanderfoot *et al.*, 1999; Surpin a Raikhel, 2004) a nachází se v prevakuole a v tonoplastu (Uemura *et al.*, 2002; Rojo *et al.*, 2003; Carter *et al.*, 2004). *Arabidopsis thaliana* mutant sgr3-1 vykázal velmi významnou redukci ve fúzi vakuol ve svěracích buňkách při otevírání průduchů indukovaném modrým světlem, což se projevilo výrazným snížením rychlosti otevírání v porovnání s WT a komplementovanou linií sgr3-1/gSGR3, speciálně v první fázi zavírání (Gao *et al.*, 2005).



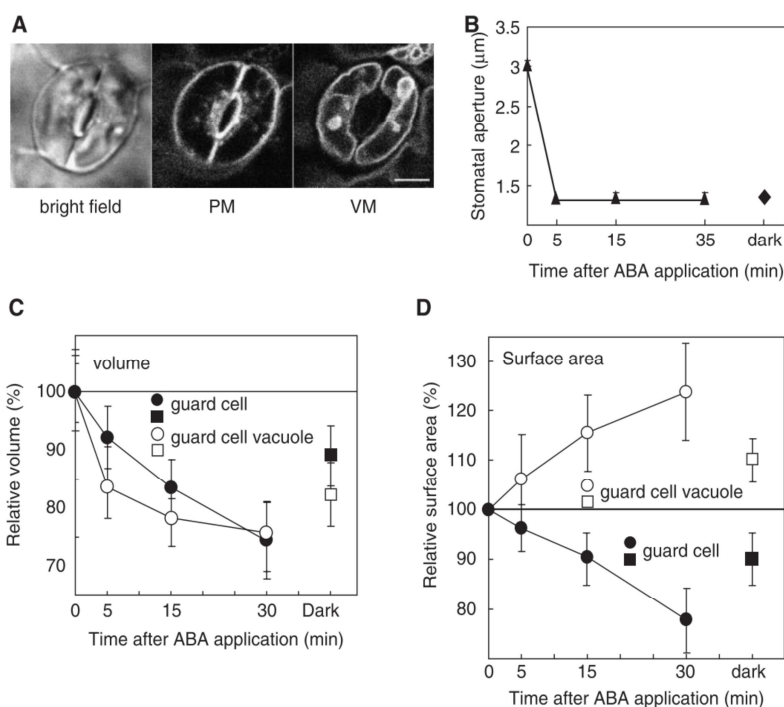
Obrázek 7: 3D rekonstrukce vakuol svěracích buněk programem REANT. Měřítko: 5 μm
Převzato z Tanaka et al. 2007

5. Propojení membránových systémů svěřacích buněk při otevírání a zavírání průduchů

Je známo, že membránové systémy všech buněk spolu významně komunikují a vyměňují si vzájemně materiál. O svěřacích buňkách toto platí ještě výrazně více neboť množství, které se přenáší mezi jednotlivými kompartmenty, může být až 20 % povrchu cytoplazmatické membrány v průběhu 10 minut (Tanaka *et al.*, 2007).

5.1 Propojení vakuoly a cytoplazmatické membrány

Poměrně přesných výsledků vzájemného ovlivňování objemu vakuoly a buňky bylo dosaženo pomocí 3D rekonstrukce snímků z CLSM svěřacích buněk *Arabidopsis thaliana* programem REANT (Kutsuna a Hasezawa 2005). Svěřací buňky světelným zářením otevřených průduchů, exprimující protein (GFP)-AtVAM3, obarvené FM4-64, měly objem $870 \mu\text{m}^3$ a jejich vakuoly měly objem $560 \mu\text{m}^3$, takže zabíraly 67 % buňky. Po 2h inkubaci ve tmě se zmenšila průduchová štěrbina z $3 \mu\text{m}$ na $1,4 \mu\text{m}$ a objem buňky i její vakuoly se shodně snížil na 80 až 90 % původního objemu. Při aplikaci ABA na otevřené průduchy se průduchy zavřely již za 5 minut a průměr průduchové štěrbiny zůstal konstantní po celou dobu pozorování. Při zavírání se shodně snížil objem vakuoly i buňky, v průběhu zavírání se však první zmenšuje objem vakuoly a až s mírným zpožděním se začne zmenšovat i objem celé buňky. Po 5 minutách v ABA již obě hodnoty dosáhnou úrovně hodnot ve svěřacích buňkách inkubovaných 2 hodiny ve tmě, objem vakuol i buněk se však dále snižuje i několik dalších minut po tom, co je již průduchová štěrbina uzavřena. Na druhou stranu se po ABA indukovaném zavření průduchu povrch tonoplastu zvýší o 20 %, zatímco povrch CM se sníží. Významné na tomto je, že povrch, o který se CM zmenší se přibližně rovná povrchu, o který se tonoplast zvětší (Tanaka *et al.*, 2007).



Obrázek 8: Kvantifikace objemu a povrchu pomocí programu REANT.

(A) Obraz průduch ve světelném mikroskopu a v konfokálním fluorescenčním mikroskopu. Plazmatická membrána (PM) a vakuolární membrána (VM) jsou vizualizovány FM4-64, respektive GFP-AtVAM3; (B) Změny velikosti průduchové štěrbin v průběhu zavírání; (C) Relativní změny objemu svěracích buněk a jejich vakuol; (D) Relativní změny povrchu plazmatické membrány a tonoplastu.

Převzato z Tanaka (2007)

5.2 Endosomální komponenty

Při 1 hodinové inkubaci svěracích buněk v barvivu FM4-64 se endocytózou obarví i všechny vnitřní membrány. Toto umožní přesně hodnotit jejich dynamiku při změnách velikosti svěracích buněk v důsledku působení hormonu ABA. Ve svěracích buňkách *Vicia faba* byla jasně detekovatelná plazmalema, tonoplast i endozomy. Ve svěracích buňkách otevřených průduchů bylo následné zastoupení obarvených membrán: 41 % CM, 15 % tonoplast a 44 % endosomální membrány. Ve svěracích buňkách zcela uzavřených průduchů pomocí ABA bylo zastoupení jednotlivých membrán 34 %, 21 % a 45 % pro CM, tonoplast a endosomální membrány. Tyto výsledky naznačují, že přebytečný membránový materiál z CM nekončí v endosomálních strukturách, ale je uložen ve vakuolární membráně (Tanaka *et al.*, 2007). Avšak při analýze databáze LIPS (Live Images of Plant Stomata – databáze 28530 snímků 930 párů průduchů) se ukázalo, že při otevírání průduchů *Arabidopsis thaliana* dochází v endoplazmatickém retikulu (ER) svěracích buněk k velmi výrazným strukturním změnám a celé retikulum se posouvá směrem k dorzální straně, kde je expanze CM největší (Higaki *et al.*, 2012). To napovídá tomu, že, ačkoliv ER není dlouhodobou zásobárnou membránového materiálu při stomatálním pohybu, hraje důležitou roli jako prostředník membránového transportu. O provázanosti ER a CM svědčí i pokusy provedené na protoplastech, kdy po smrštění protoplastu svěrací buňky, obarveného styrylovým barvivem FM-1-43 se ve vzdálenosti 1 μm pod povrchem objevila prstencovitá fluorescenční struktura

neznámého původu, která byla pod rozlišovací schopností použitého konfokálního mikroskopu (Kubitschek *et al.*, 2000). Při srovnání těchto údajů s obrázky protoplastů z TEM pořízené v roce 1993 Diekmannem *et al.*, kde se nacházela velmi podobná struktura ER v méně než mikrometrové vzdálenosti od CM, lze usuzovat, že se jedná o tutéž strukturu. Podobný přímý kontakt mezi CM a ER byl již dříve navržen na základě pozorování vzorků kořenových špiček získaných mrazovým lámáním v SEM (Craig S, Staehelin LA 1988).

6. SNARE proteiny

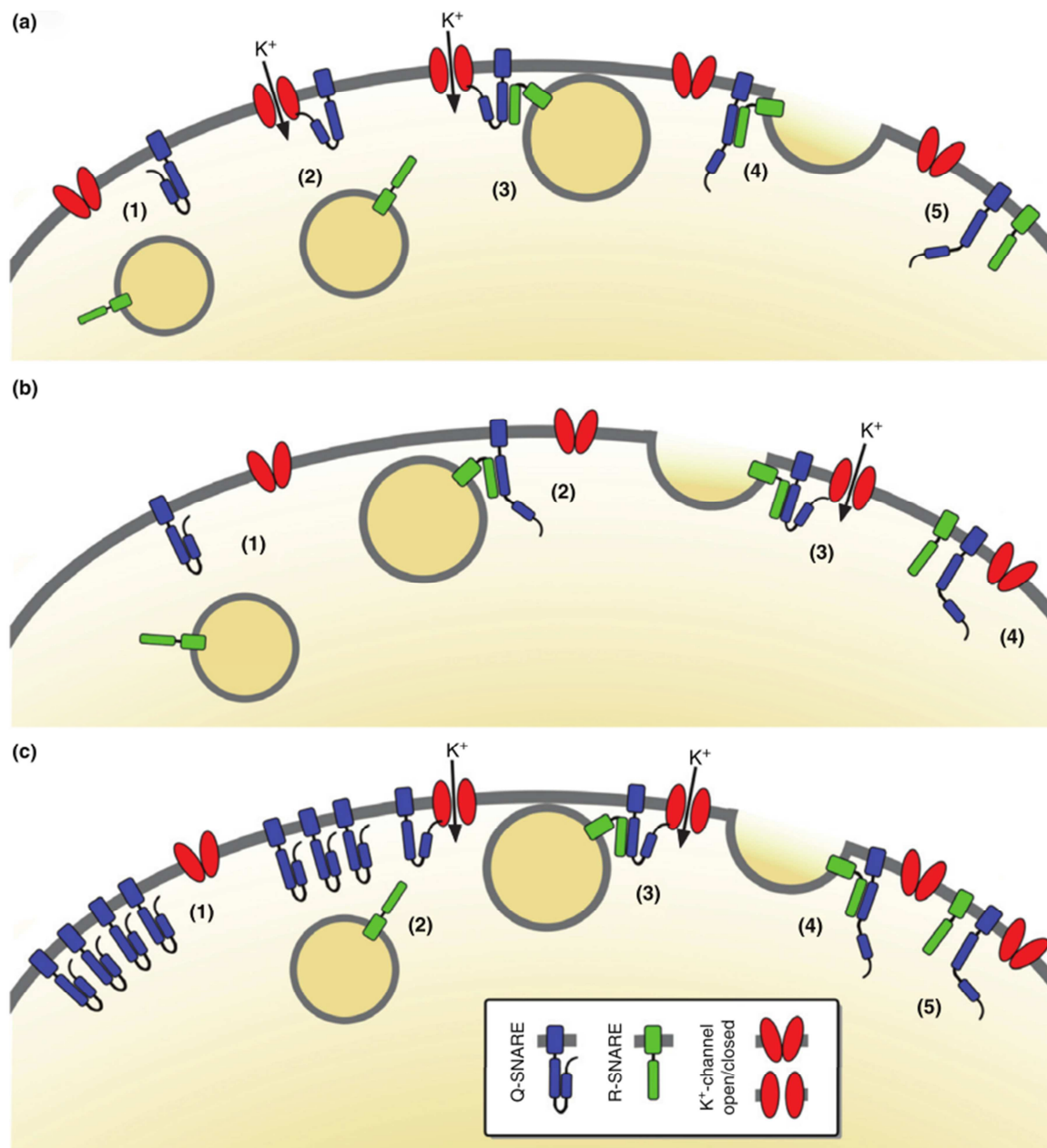
Fúzi membránových váčků a plazmatické membrány zajišťují SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) proteiny, které jsou nezbytné pro překonání hydratačních sil, jež brání tomuto spojení (Jahn a Scheller, 2006). Nadrodina SNARE proteinů zahrnuje transmembránové a membránově ukotvené proteiny, které obsahují evolučně konzervovanou skupinu 60 – 70 aminokyselin s osmi sedmi-aminokyselinovými repeticemi, tzv. SNARE motiv. Každé jednotlivé spojení membrán vyžaduje sadu 4 SNARE, které se vždy skládají z 3 nebo 4 různých SNARE proteinů, jejichž SNARE motivy spolu tvoří paralelní α -helix o vysoké stabilitě. V tomto helixu lze rozeznat 16 po sobě jdoucích vrstev, které jsou s výjimkou centrální vrstvy 0, hydrofobní. Vrstva 0 obsahuje 3 glutaminové zbytky a 1 argininový zbytek. Podle těchto zbytků se SNARE proteiny dělí na Q-SNARE a R-SNARE. Q-SNARE jsou dále rozeznávány na Qa, Qb, a Qc podle svých submotivů (Brunger 2005; Jahn a Scheller 2006). Obecně platí, že R-SNARE se nachází na váčku a Q-SNARE na cílové membráně. Současné modely pracují s představou, že vytvoření komplexu mezi Q- a R-SNARE je poháněno spontánním, termodynamicky výhodným procesem proteinové konformace, která přitáhne membrány dohromady a spojí je za využití volné energie, která se uvolní konformační změnou SNARE komplexu (Jahn *et al.*, 2003; Grefen *et al.*, 2011).

Vzhledem k živočišným a kvasinkovým buňkám obsahuje genom rostlin rozšířenou sadu pro SNARE proteiny. Tyto geny vznikaly genovou duplikací, z které nejvýznamnější se udála před 450 miliony let ve spojení s vývojem mnohobuněčnosti (Sanderfoot, 2007). Například genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje geny pro 18 Qa, 18 Qb a Qc SNARE a 3 SNAP-25 podobné SNARE. Podobné počty vykazuje i genom rýže (*Oryza sativa*) (Sutter *et al.*, 2006). Můžeme spekulovat, že tento vysoký počet zajišťuje rostlinným buňkám možnost velmi specifického a precizního endomembránového transportu.

6.1 Propojení SNARE s transportem iontů

Studium heterologní exprese a elektrofyziologické záznamy ukázaly spojitost mezi SYP121 (protein z nadrodiny SNARE podobný syntaxinu), podjednotkou K^+ kanálů KC1 (také nazývanou KAT3) a jejím partnerem AKT1. Ukázalo se, že SYP121 je kritický pro zajištění K^+ proudu zprostředkovaného tímto kanálem (Honsbein *et al.*, 2009). Stejně tak SYP121 interaguje s KAT1 kanálem. K oběma těmto K^+ kanálům se váže pomocí vazebného místa na N konci. Toto FxRF místo se váže na specifický motiv obou kanálů (Grefen *et al.*, 2009, Grefen *et al.*, 2011).

FxRF motiv je svou strukturou podobný části Qa-SNARE proteinů, která je zodpovědná za vazbu Sec/Munc18 (Grefen *et al.*, 2010a), což jsou evolučně vysoce konzervativní proteiny, jež se podílejí na specifičnosti a regulaci SNARE zprostředkované fúzi membrán (Burgoyne 2007). SM proteiny jsou schopny svou vazbou na N-koncový fenylalanin FxRF motivu výrazně zrychlit sestavení SNARE komplexu. (Grefen *et al.*, 2010a)



Obrázek 9: 3 možné modely koordinace SNARE proteinů s K^+ kanály. Pro jasnost jsou zde znázorněny jen Qa- a R-SNARE.

a) Vazba SYP121 s K^+ kanály vede k tzv. otevřenému stavu Qa-SNARE, čímž umožní formaci SNARE komplexu; b) Vazba SYP121 a K^+ kanálu má podobný účinek jako SM protein, tedy stabilizaci SNARE komplexu, který je následně schopen dokončit membránovou fúzi; c) K^+ kanál se asociuje se SYP121, čímž ho uvolní z organizovaného shluku, a tím umožní formaci SNARE komplexu.

Převzato z Grefen (2011)

6.2 Dynamika SNARE

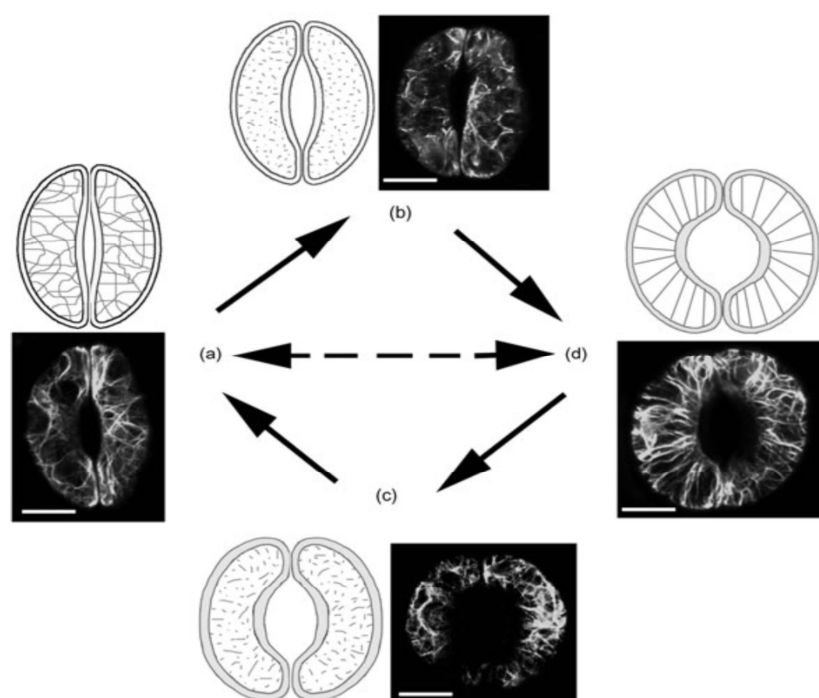
Při vizualizaci SYP121 pomocí YFP fúzního proteinu exprimovaného pod jeho přirozeným promotorem vyšlo najevo, že hustota SYP121 je přibližně 4000 molekul na μm^{-2} (Grefen *et al.*, 2010b; Gall *et al.*, 2010; Grefen *et al.*, 2011). K nejvyššímu nárůstu povrchu cytoplazmatické membrány u buněk pokožky kukuřice (*Zea mays*) dochází rychlostí $3,8 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Phillips *et al.*, 1988). Při předpokladu konstantní rychlosti fúze váčků $0,2 \text{ s}^{-1}$ (Thiel *et al.*, 2000) a průměrnou velikostí povrchu váčku $0,15 \mu\text{m}^2$ (Meckel *et al.*, 2005; Gall *et al.*, 2010) lze této rychlosti dosáhnout méně než 130 místy s aktivní exocytózou. Pokud se každé jednotlivé fúze účastní 4 SNARE proteiny, nebude třeba více než 520 simultánně aktivních SNARE na celou buňku (Grefen *et al.*, 2011). Toto číslo se velmi blíží počtu K^+ kanálů na plazmalemě (Tester, 1990). Počet SNARE proteinů je tedy více než dostatečný pro svěrací buňky, kde změna povrchu při otevírání průduchů zřídka přesáhne rychlost $0,1 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Meckel *et al.*, 2005). Tyto propočty nasvědčují tomu, že v buňce je i při extrémní rychlosti růstu CM aktivních jen 0,01 % SNARE proteinů. To znamená, že buňka musí udržovat konstantní, vysoce organizovaný pool těchto proteinů. Skutečně jsou známy organizované shluky některých Qa-SNARE, které jsou organizovaně nahuštěny na jednom místě membrány (Sieber *et al.*, 2007). Stejně tak jsou známy i shluky jiných specializovaných SNARE (Low *et al.*, 2006).

7. Vliv cytoskeletu na funkci svěřacích buněk

Cytoskelet svěřací buňky, stejně jako jiné rostlinné buňky, obsahuje mikrofilamenta a mikrotubuly. Aktinový cytoskelet je ve svěřacích buňkách nejprozkoumanější a leží v centru pozornosti již mnoho let. V posledních letech začíná být zaměřován pohled i na mikrotubuly.

7.1. Dynamika aktinového cytoskeletu a jeho vliv na funkci svěřacích buněk

Ve svěřacích buňkách byla zaznamenána složitá přestavba aktinu při stomatálních pohybech. V otevřených průduších mnoha druhů jsou aktinová vlákna svěřacích buněk uspořádána do paprskovitých prstencových struktur nacházejících se pod povrchem CM (Kim *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 2008). V zavřených průduších byly naproti tomu zaznamenány dlouhá, náhodně uspořádaná aktinová vlákna, která se nacházela po celé cytoplazmě. (Hwang a Lee, 2001; Gao *et al.*, 2008) Vzhledem k tomu, že inhibice aktinové depolymerizace vede k zeslabení a zpomalení stomatálních pohybů a naopak posílení aktinové depolymerizace vede ke zrychlení (Hwang a Lee, 2001), lze usuzovat, že přestavba těchto vláken je nezbytná pro stomatální pohyby (Gao *et al.*, 2008, Gao *et al.*, 2009). Z některých studií také vyplývá, že na dynamice aktinu v buňce je závislá aktivita některých K^+ a Ca^{+2} kanálů (Macrobbie a Kurup 2007; Zhang *et al.*, 2007) a akvaporinů (Vera-Estrella *et al.*, 2004; Cui a Wang, 2007).



Obrázek 10: Dynamika aktinových filament ve svěřacích buňkách během průduchových pohybů. Aktinové filameny (a) v zavřených průduších; (b) v otevírajících se průduších; (c) v zavírajících se průduších; (d) v zavřených průduších. Aktin v tabáku je obarven GFP-mTn
Převzato z Gao *et al.* (2009)

7.1.1 Vliv přestavby aktinu na dynamiku svěřací buňky

Bylo dokázáno, že aktin hraje důležitou roli v pohybu a poloze organel rostlinných buněk (Chhabra a Higgs 2007). Kromě v korové oblasti buňky jsou aktinová vlákna ve svěřacích buňkách kolokalizována i s tonoplastem (Gao *et al.*, 2009). Zdá se však, že vztah aktinu k vakuolárním membránám je ještě důležitější, než se zdálo. Například aplikace bistheonellidu A, inhibitoru aktinové polymerace, vede ke vzniku malých sférických vakuol a rozpadu tubulárních struktur vakuolární membrány (Kutsuna *et al.*, 2003), aplikace cytochalasinu D, aktin depolymerizujícího inhibitoru, zastavuje konstantní změnu a pohyb tonoplastových struktur (Uemura *et al.*, 2002) a aplikace myozinového inhibitoru BDM (2,3-Butandion-monoxim) inhibuje veškeré dynamické procesy transvakuolárních struktur v BY-2 tabákové kultuře (Hoffmann a Nebenführ, 2004).

Při použití cytochalasinu D na svěřací buňky otevírajícího průduchu *Arabidopsis thaliana* se tento průduch otevře pouze napůl (průduchová štěrbina má pouze 1 – 2 μm) a 14 % těchto buněk obsahuje malé nespojené vakuoly. Při použití phalloidinu, což je inhibitor aktinové depolymerizace (uměle stabilizuje F-aktin), 21 % buněk vykazuje malé nefúzované vakuoly. Kontrola jich obsahuje pouze 5 %. Z toho vyplývá, že reorganizace aktinu koreluje s reorganizací vakuoly (Li *et al.*, 2012). Avšak *arp2* a *arp3* mutanty vykazovaly pouze zpomalené, nikoliv inhibované otevírání, neboť po 120 minutách světelného ozařování dosáhli takřka stejné velikosti průduchové štěrby, jako kontrolní buňky. Ze začátku se i v těchto mutantech objevovaly neorganizované malé vakuoly jako při použití aktinových jedů, avšak tyto vakuoly po delší době také fúzovaly. ARP2/3 komplex, byť klíčový rozvětvovací protein a nukleační agent aktinu (Maisch *et al.*, 2009), který se podílí na správné morfogenezi a vývoji buňky, tedy není hlavní složkou reorganizace vakuol při stomatálních pohybech. (Li *et al.*, 2012)

Jak již bylo psáno výše, při stomatálních pohybech hraje reorganizace vakuoly svěřacích buněk velmi důležitou roli a tato reorganizace je z velké části závislá na tvorbě transvakuolárních struktur. V současné době probíhá výzkum, který se snaží ukázat klíčové proteinové spojovatele tonoplastu a aktinového cytoskeletu. Existuje několik známých proteinů zajišťujících spojení aktinu s endomembránovým systémem. CHUP1 (Oikawa *et al.*, 2003), KAM1/MUR3 (Tamura *et al.*, 2005) a ERD10 (Egerton-Warburton *et al.*, 1997) jsou zapojeny do interakce mezi membránovými organelami a aktinovým cytoskeletem. Myosin, dynamin a fimbrin byly detekovány v tonoplastu (Carter *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2007). Za zmínku stojí, že jediná jednotka myosinu dokáže vyvinout dostatečnou sílu, aby přetrhla

aktinové vlákno, takže se sama může podílet na jejich reorganizaci. (Vogel *et al.*, 2012) Dalšími předpokládanými důležitými proteiny v interakci aktinu s tonoplastem by mohly být proteiny z rodiny forminů (Gao *et al.*, 2009). Forminy totiž obsahují domény FH1, která se může navazovat na aktin vázající profilin, doménu FH2, která má aktin nukleární aktivitu u *S. cerevisiae* (Goode a Eck, 2007), a obsahují transmembránovou či PTEN doménu (Cvrčková, 2000; Grunt *et al.*, 2008; Cvrčková, 2012). Bylo prokázáno, že zvýšená exprese FORMIN 1 vede k formaci vysokého počtu aktinových vláken a deformaci v klíčícím pylu (Cheung a Wu, 2004).

7.2 Vliv přestavby mikrotubulů na dynamiku svěrací buňky

Stejně jako aktinový i mikrotubulární skelet svěracích buněk hraje klíčovou úlohu při stomatálních pohybech. Nejenže určuje směr růstu celulosních vláken buněčné stěny, čímž je zodpovědný za její unikátní strukturu, která umožňuje pohyby průduchů tak, jak je známe (Galatis a Apostolakis, 2004), ale účastní se těchto pohybů přímo (Lahav *et al.*, 2004; Eisinger *et al.*, 2012). Ve svěracích buňkách otevřených průduchů mají mikrotubuly radiální uspořádání a v blízkosti průduchové štěrbině se nachází přes 50 mikrotubulárních struktur v orientaci kolmé k epidermis. V buňce zavřeného průduchu je těchto mikrotubulárních struktur méně než 20 a mají nižší uspořádanost. Pojem mikrotubulární struktura zde může znamenat jedno nebo i více mikrotubulárních vláken, které CLMS rozliší jako jeden světelný bod. Jejich počet v korové části buňky, měřený pomocí fluorescence fúzního proteinu GFP-TUA5, se v průběhu prvních 30 minut zavírání průduchu pomocí ABA zmenšil, a naopak fluorescence cytoplazmy se zvýšila o 60 %. Buňky, zavřené pomocí 12h inkubace ve tmě i aplikací peroxidu vodíku, vykazovaly všechny podobný fenotyp. Tento jev byl zcela vratný po otevření průduchu pomocí světla. Po aplikaci oryzalinu, látky depolymerizující mikrotubuly, bylo zcela inhibováno otevření zavřeného průduchu světlem, ale zavření otevřeného průduchu zůstalo jen mírně zpomaleno ve srovnání s kontrolou. Naopak aplikace taxolu, látky stabilizující mikrotubuly, inhibovalo zavření průduchu, avšak otevření proběhlo pouze mírně zpomalně (Eisinger *et al.*, 2012). Mikrotubuly jsou tedy velmi silně zapojeny do procesu zavírání a otevírání průduchů, bohužel však doposud leží na okraji zájmu, a tak není znám důvod, proč inhibice jejich reorganizace vede k inhibici stomatálních pohybů.

8. Závěr

Průduchy zajišťují kontakt vnitřního prostředí rostliny s okolím. Děje se tak smršťováním a nabobtnáváním svěracích buněk, což způsobuje jejich tvarovou změnu, čímž se mění průměr svěrací štěrby. Klíčovým jevem při tomto procesu je změna turgoru svěrací buňky, která je zapříčiněna řízeným tokem K^+ iontů (zejména při rychlém pohybu indukovaném ABA nebo CO_2) a také metabolickou aktivitou buňky (v cirkadiánním rytmu). Při otevření a zavření průduchu může svěrací buňka měnit svůj objem až o 300 % a povrch až o 40 %. Tato změna je doprovázena dynamickou změnou cytoplazmatické membrány a tonoplastu. Při zavření buňky se 20 % povrchu cytoplazmatické membrány internalizuje pomocí endocytických váčků. Tonoplast při zavírání naopak získává povrch, který se rovná přibližně povrchu, který se internalizuje endocytózou z cytoplazmatické membrány. Nicméně zdá se, že obsah internalizovaných váčků se nemísí s obsahem vakuoly, a tedy změny povrchu CM a tonoplastu jsou pravděpodobně korelovány nepřímo. Na transportu těchto váčků se významnou měrou podílejí SNARE proteiny, ze zatím prozkoumaných se jako jeden z nejdůležitějších jeví SYP121. Zbylá přebytečná membrána z CM se skládá do membránových vychlípenin a povrch vakuoly se zvrásňuje a dochází k tvorbě TVM, čímž stoupá komplexita vakuoly.

Aktinový i mikrotubulární cytoskelet svěracích buněk se také silně účastní stomatálních pohybů, neboť oba prodělávají velkou strukturní změnu a inhibice přestavby těchto cytoskeletů vede k inhibici otevření nebo zavření průduchu. Zapojení těchto cytoskeletálních systémů na molekulární úrovni však není zcela objasněno. U aktinového cytoskeletu se předpokládá zapojení forminů a jsou známy i některé další proteiny účastnící se vazby aktinu k membránám. Spojení mikrotubulárního a membránového systému však zůstává ještě zcela neobjasněno.

Svěrací buňky jsou již desítky let modelovým systémem pro výzkum vnímání změn prostředí buňkou a signálních drah, které regulují jejich otvírání a zavírání. Za poslední desetiletí bylo poznáno mnoho z těchto drah a již dokážeme poměrně přesně modelovat chování průduchů v různých podmínkách (například program OnGuard (Hills *et al.*, 2012), avšak stále jsme ještě velmi vzdáleni od komplexního poznání molekulární podstaty otevírání a zavírání průduchů, a to i u tak prozkoumaných druhů jako jsou *Vicia faba* a *Arabidopsis thaliana*. Procesy koordinace transportu endomembrán mezi CM a tonoplastem při regulaci průduchů jsou posud zcela nepoznány.

Seznam použité literatury

- Ashford AE, Allaway WG** (2002) The role of the motile tubular vacuole system in mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 244: 177–187
- Bearce BC, Kohl HC** (1970) Measuring osmotic pressure of sap within live cells by means of a visual melting point apparatus. *Plant Physiology* 46, 515–519
- Blatt MR, Leyman B, Geelen D** (1999) Molecular events of vesicle trafficking and control by SNARE proteins in plants. *The New phytologist* 44, 388–418
- Blatt MR** (2000) Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annual review of cell and developmental biology*, 16(1), 221–241
- Brunner AT** (2005) Structure and function of SNARE and SNARE-interacting proteins. *Quarterly reviews of biophysics*, 38(1), 1–48
- Butenko RG** (1979) Cultivation of isolated protoplasts and hybridization of somatic plant cells. *Academic Press*.
- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila E, Girke T, Raikhel N** (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* 16, 3285–3303
- Cheung AY, Wu HM** (2004) Overexpression of an *Arabidopsis* formin stimulates supernumerary actin cable formation from pollen tube cell membrane. *The Plant Cell* 16, 257–269
- Chhabra ES, Higgs HN** (2007) The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nature Cell Biology* 9, 1110–1121
- Craig S, Staehelin LA** (1988) High pressure freezing of intact plant tissues. Evaluation and characterization of novel features of the endoplasmic reticulum and associated membrane systems. *European journal of cell biology*, 46(1), 81
- Cram WJ** (1980) Pinocytosis in plants. *The New Phytologist* 84, 1–17
- Cui XH, Wang XC** (2007) Involvement of *Vicia faba* L. aquaporin in regulation of stomatal movement by microfilament. *Plant Physiology Communications* 43, 61–64
- Cvrčková F** (2000) Are plant formins integral membrane proteins? *Genome Biology* 1, research 001–007
- Cvrčková F** (2012) Formins: emerging players in the dynamic plant cell cortex. *Scientifica*, 2012
- Diekmann W, Hedrich R, Raschke K, Robinson DG** (1993) Osmocytosis and vacuolar fragmentation in guard cell protoplasts: their relevance to osmotically-induced volume changes in guard cells. *Journal of Experimental Botany* 44, 1569–1577
- Edwards M, Meidner H, Sheriff DW** (1976) Direct measurement of turgor pressure potentials of guard cells: II. The mechanical advantage of subsidiary cells, the spannungphase, and the optimum leaf water deficit. *Journal of Experimental Botany* 27, 163–171
- Egerton-Warburton LM, Balsamo R, Close TJ** (1997) Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* 101, 545–555
- Eisinger W, Ehrhardt D, Briggs W** (2012) Microtubules are essential for guard-cell function in *Vicia* and *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 5(3), 75–84
- Franks PJ, Cowan IR, Farquhar OD** (1998) A study of stomatal mechanics using the cell pressure probe. *Plant, Cell & Environment* 21, 94–100
- Franks PJ, Buckley TN, Shope JC, Mott KA** (2001) Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe. *Plant Physiology* 125, 1577–1584

- Fricker MD, White N** (1990) Volume measurement of guard cell vacuoles during stomatal movements using confocal microscopy. *Transactions of the Microscopical Society of London* 1, 345–348
- Galatis B, and Apostolakis P** (2004) The role of cytoskeleton in the morphogenesis and function of stomatal complexes. *New Phytologist* 161, 613–639
- Gall L, Stan RC, Kress A, Hertel B, Thiel G, Meckel T** (2010) Fluorescent detection of fluid phase endocytosis allows for in vivo estimation of endocytic vesicle sizes in plant cells with subdiffraction accuracy. *Traffic* 11, 548–559
- Gao XQ, Li CG, Wei PC, Zhang XY, Chen J, Wang XC** (2005) The dynamic changes of tonoplasts in guard cells are important for stomatal movement in *Vicia faba*. *Plant Physiology* 139, 1207–1216
- Gao XQ, Chen J, Wei PC, Ren F, Chen J, Wang XC** (2008) Array and distribution of actin filaments in guard cells contribute to the determination of stomatal aperture. *Plant Cell Reports* 581, 1655–1665
- Gao XQ, Wang XL, Ren F, Chen J, Wang, XC** (2009). Dynamics of vacuoles and actin filaments in guard cells and their roles in stomatal movement. *Plant, cell & environment*, 32(8), 1108–1116
- Glinka Z** (1971) The effect of epidermal cell water potential on stomatal response to illumination of leaf discs of *Vicia faba*. *Physiologia Plantarum* 24, 476–479
- Grefen C, Obrdlik P, Harter K** (2009) The determination of protein-protein interactions by the mating-based split-ubiquitin system (mbSUS). *Methods in Molecular Biology*, 479, 217–233
- Grefen C, Chen ZH, Honsbein A, Donald N, Hills A, Blatt MR** (2010a) A novel motif essential for SNARE interaction with the K⁺ channel KC1 and channel gating in Arabidopsis. *Plant Cell* 22, 3076–3092
- Grefen C, Donald N, Hashimoto K, Kudla J, Schumacher K, Blatt MR** (2010b) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant Journal*, 64, 355–365
- Grefen C, Honsbein A, Blatt MR** (2011) Ion transport, membrane traffic and cellular volume control. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 332–339
- Grunt M, Žárský V, Cvrčková F** (2008) Roots of angiosperm formins: the evolutionary history of plant FH2 domain-containing proteins. *BMC evolutionary biology* 8(1), 115.
- Gobert A, Isayenkov S, Voelker C, Czempinski K, Maathuis FJM** (2007) The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K⁺ conductance and plays a role in K⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 10726–10731
- Goode BL, Eck MJ** (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 593–627
- Gordon-Kamm WJ, Steponkus PL** (1984) The influence of cold acclimation on the behavior of the plasma membrane following osmotic contraction of isolated protoplasts. *Protoplasma* 123, 161–173
- Hepler PK** (1981) Morphogenesis of tracheary elements and guard cells. In: Kiermayer O, ed. *Cytomorphogenesis in plants*. Wien, NY, USA: Springer-Verlag, 327–347
- Higaki T, Goh T, Hayashi T, Kutsuna N, Kadota Y, Hasezawa S, Sano T, Kuchitsu K** (2007) Elicitor-induced cytoskeletal rearrangement relates to vacuolar dynamics and execution of cell death: in vivo imaging of hypersensitive cell death in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* 48, 1414–1425
- Higaki T, Kutsuna N, Hosokawa Y, Akita K, Ebine K, Ueda T, Kondo N, Hasezawa S** (2012) Statistical organelle dissection of Arabidopsis guard cells using image database LIPS. *Scientific reports*, 2

- Hills A, Chen ZH, Amtmann A, Blatt MR, Lew VL** (2012) OnGuard, a computational platform for quantitative kinetic modeling of guard cell physiology. *Plant physiology*, 159(3), 1026-1042
- Hoffmann A, Nebenführ A** (2004) Dynamic rearrangements of transvacuolar strands in BY-2. *Protoplasma* 224, 201–210
- Homann U.** (1998) Fusion and fission of plasma-membrane material accommodates for osmotically induced changes in the surface area of guard-cell protoplasts. *Planta* 206, 329–333
- Honsbein A, Sokolovski S, Grefen C, Campanoni P, Pratelli R, Paneque M, Chen ZH, Johansson I, Blatt MR** (2009) A tripartite SNARE-K⁺ channel complex mediates in channel-dependent K⁺ nutrition in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21, 2859-2877
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Poree F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very AA** (2003) The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100, 5549–5554
- Hsyu PH, Gislson LG, Hui AC, Giacomini KM** (1988) Interactions of organic anions with the organic cation transporter in renal BBMVs. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 254(1), F56-F61
- Humble GD, Raschke K** (1971) Stomatal opening quantitatively related to potassium transport: evidence from electron probe analysis. *Plant Physiology* 48, 447–453
- Hurst AC, Meckel T, Tayefeh S, Thiel G, Homann U** (2004) Trafficking of the plant potassium inward rectifier KAT1 in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Journal* 37, 391–397
- Hwang JU, Lee Y** (2001). Absciscic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiology* 125, 2120–2128
- Isayenkov S, Isner JC, Maathuis FJ** (2010) Vacuolar ion channels: Roles in plant nutrition and signalling. *FEBS Letters* 584, 1982–1988
- Jahn R, Lang T, Südhof TC** (2003) Membrane fusion. *Cell*, 112(4), 519-533.
- Jahn R, Scheller RH** (2006). SNAREs—engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), 631-643
- Kim M, Hepler PK, Eun SO, Ha KS, Lee Y** (1995) Actin filaments in mature guard cells are radially distributed and involved in stomatal movement. *Plant Physiology* 109, 1077–1084
- Kreft M, Zorec R** (1997) Cell-attached measurements of attofarad capacitance steps in rat melanotrophs. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 434, 212–214
- Kubitscheck U, Homann U, Thiel G** (2000) Osmotically evoked shrinking of guard-cell protoplasts causes vesicular retrieval of plasmamembrane into the cytoplasm. *Planta* 210, 423–431
- Kutsuna N, Kumagai F, Sato MH, Hasezawa S** (2003) Three-dimensional reconstruction of tubular structure of vacuolar membrane throughout mitosis in living tobacco cells. *Plant and Cell Physiology* 44, 1045–1054
- Kutsuna, N. and Hasezawa, S.** (2005) Morphometrical study of plant vacuolar dynamics in single cells using three-dimensional reconstruction from optical sections. *Microscopy Research and Technique* 68, 296–306
- Lahav M, Abu-Abied M, Belausov E, Schwartz A, Sadot E** (2004) Microtubules of guard cells are light sensitive. *Plant Cell Physiology* 45, 573–582
- Lambrechts D, Schroeder JI, Verbelen JP** (1992) The influence of osmolarity on the surface properties of the plasma membranes of isolated guard cell protoplasts of *Vicia faba* L. *Plant Physiology* 11, 25–32

- Li BB, Liu GF, Deng YY, Xie M, Feng ZG, Sun MZ, et al.** (2010) Excretion and folding of plasmalemma function to accommodate alterations in guard cell volume during stomatal closure in *Vicia faba* L. *Journal of Experimental Botany* 61, 3749-58
- Li LJ, Ren F, Gao XQ, Wei PC, Wang XC** (2012) The reorganization of actin filaments is required for vacuolar fusion of guard cells during stomatal opening in *Arabidopsis*. *Plant, cell & environment*
- Low SH, Vasanji A, Nanduri J, He M, Sharma N, Koo M, Drazba J, Weimbs T** (2006) Syntaxins 3 and 4 are concentrated in separate clusters on the plasma membrane before the establishment of cell polarity. *Molecular Biology of the Cell* 17, 977-989
- MacRobbie EAC** (1980) Osmotic measurements on stomatal cells of *Commelina communis* L. *Journal of Membrane Biology* 53, 189-198
- MacRobbie EAC** (1995) ABA-induced ion efflux in stomatal guard cells multiple actions of ABA inside and outside the cell. *Plant Journal* 7, 565-76
- MacRobbie EAC** (1997) Signalling in guard cells and regulation of ion channel activity. *Journal of Experimental Botany* 48, 515-28
- MacRobbie EA, Kurup S** (2007) Signalling mechanisms in the regulation of vacuolar ion release in guard cells. *New Phytologist* 175, 630-640
- Maisch J, Fišerová J, Fischer L, Nick P** (2009) Tobacco Arp3 is localized to actin-nucleating sites in vivo. *The Journal of Experimental Botany* 60, 603-614
- Meckel T, Hurst AC, Thiel G, Homann U** (2004) Endocytosis against high turgor: intact guard cells of *Vicia faba* constitutively endocytose fluorescently labeled plasma membrane and GFP-tagged K⁺-channel KAT1. *The Plant Journal* 39, 182-193
- Meckel T, Hurst AC, Thiel G, Homann U** (2005) Guard cells undergo constitutive and pressure-driven membrane turnover. *Protoplasma* 226, 23-29
- Moriyasu Y, Hattori M, Jauh G, Rogers J** (2003) Alpha tonoplast intrinsic protein is specifically associated with vacuole membrane involved in an autophagic process. *Plant Cell Physiol* 44, 795-802
- Nakamura RL, McKendree WL, Hirsch RE, Sedbrook JC, Gaber RF, Sussman MR** (1995) Expression of an *Arabidopsis* potassium channel gene in guard cells. *Plant Physiology*, 109(2), 371-374
- Neher E, Marty M** (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 21, 6712-6716
- Nonami H, Schulze E-D, Ziegler H** (1990) Mechanisms of stomatal movement in response to air humidity, irradiance and xylem water potential. *Planta* 183, 57-64
- Olbrich K, Rawicz W, Needham D, Evans E** (2000) Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophysical Journal* 79, 321-327
- Oikawa K, Kasahara M, Kiyosue T, Kagawa T, Suetsugu N, Takahashi F, Kanegae T, Niwa Y, Kadota A, Wada M** (2003) CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING1 is essential for proper chloroplast positioning. *The Plant Cell* 15, 2805-2815
- Palevitz BA, Hepler PK** (1976) Cellulose microfibril orientation and cell shaping in developing guard cells of *Allium*: the role of microtubules and ion accumulation. *Planta* 132, 71-93
- Pandey S, Zhang W, and Assmann SM** (2007) Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters* 581, 2325-2336
- Phillips GD, Preshaw C, Steer MW** (1988) Dictyosome vesicle production and plasma-membrane turnover in auxin-stimulated outer epidermal-cells of coleoptile segments from *avena-sativa* (L). *Protoplasma* 145, 59-65
- Pilot G, Lacombe B, Gaymard K, Cherel I, Boucherez J, Thibaud JB, Sentenac H,** (2001) Guard cell inward K⁺ channel activity in *Arabidopsis* involves expression of the

- twin channel subunits KAT1 and KAT2. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 3215–3221
- Raschke K, Fellows MP** (1971) Stomatal movement in *Zea mays*, shuttle of potassium and chloride ions between guard cells and subsidiary cells. *Planta* 1110, 296–316
- Raschke K, Dickerson M** (1973) Changes in shape and volume of guard cells during stomatal movement. *Plant Res* 1972, 149–153
- Raschke K** (1979) in *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Physiology of Movements*, ed. Feinleib, H. W. A. M. E. (Springer, New York), Vol. 7, 383–441
- Reisen D, Marty F, Leborgne-Castel N** (2005) New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. *BMC Plant Biology* 5, 1–13
- Roelfsema MRG, and Hedrich R** (2005) In the light of stomatal opening: new insights into “the Watergate”. *The New phytologist* 167, 665–691.
- Rojo E, Zouhar J, Kovaleva V, Hong S, Raikhel N** (2003) The AtC-VPS protein complex is localized to the tonoplast and the prevacuolar compartment in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell* 14, 361–369
- Sanderfoot AA, Kovaleva V, Zheng H, Raikhel NV** (1999) The t-SNARE AtVAM3p resides on the prevacuolar compartment in *Arabidopsis* root cells. *Plant Physiology* 121, 929–938
- Sanderfoot A** (2007) Increases in the number of SNARE genes parallels the rise of multicellularity among the green plants. *Plant physiology*, 144(1), 6-17
- Sato M, Nakamura N, Ohsumi Y, Kouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Wada Y** (1997) The AtVAM3 encodes a syntaxin-related molecule implicated in the vacuolar assembly in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 24530–24535
- Saxton MJ, Breidenbach RW** (1988) Receptor-mediated endocytosis in plants is energetically feasible. *Plant Physiology* 86, 993–995
- Shackel KA** (1987) Direct measurement of turgor and osmotic potential in individual epidermal cells. *Plant Physiology* 83, 719–722
- Sharpe PJH, Wu H, Spence RD** (1987) Stomatal mechanics. In E Zeiger, GD Farquhar, IR Cowan, eds, *Stomatal Function*. Stanford University Press, Stanford, CA, pp 91–114
- Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, and Kinoshita T** (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annual Review of Plant Biology* 58, 219–247
- Shope JC, DeWald DB, Mott KA** (2003) Changes in surface area of intact guard cells are correlated with membrane internalization. *Plant Physiology* 133, 1314–1321
- Schmidt UG, Endler A, Schelbert S, Brunner A, Schnell M, Neuhaus HE, Marty-Mazars D, Marty F, Baginsky S, Martinoia E** (2007) Novel tonoplast transporters identified using a proteomic approach with vacuoles isolated from cauliflower buds. *Plant Physiology* 145, 216–229
- Schroeder JJ, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D** (2001) Guard cell signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52, 627–658
- Sieber JJ, Willig KI, Kutzner C, Gerding-Reimers C, Harke B, Donnert G, Rammner B, Eggeling C, Hell SW, Grubmüller H, Lang T** (2007) Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science* 317, 1072–1076
- Surpin M, Raikhel N** (2004) Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Cell Biology* 5, 100–109
- Sutter JU, Campanoni P, Tyrrell M, Blatt MR** (2006) Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ channel at the plasma membrane. *The Plant Cell* 18, 935–954

- Sutter JU, Campanoni P, Blatt MR, Paneque M** (2006) Setting SNAREs in a different wood. *Traffic*, 7(6), 627-638
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MRG, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K, Hedrich R** (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2917-2921
- Talbott LD, Zeiger E** (1993) Sugar and organic acid accumulation in guard cells of *Vicia faba* in response to red and blue light. *Plant Physiology* 102, 1163–1169
- Talbott LD, Zeiger E** (1996) Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation, *Plant physiol* 111, 1051-1057
- Tamura K, Shimada T, Kondo M, Nishimur M, Hara-Nishimura I** (2005) KATAMARI1/MURUS3 is a novel golgi membrane protein that is required for endomembrane organization in Arabidopsis. *The Plant Cell* 17, 1764–1776
- Tanaka Y, Kutsuna N, Kanazawa Y, Kondo N, Hasezawa S, Sano T** (2007) Intra-vacuolar reserves of membranes during stomatal closure: the possible role of guard cell vacuoles estimated by 3-D reconstruction. *Plant and Cell Physiology* 48, 1159–1169
- Tester M** (1990) Plant ion channels: whole-cell and single-channel studies. *New Phytology* 114, 305-340
- Thiel G, Rupnik M, Zorec R.** (1994) Raising the cytosolic Ca^{2+} concentration increases the membrane capacitance of maize coleoptile protoplasts: evidence for Ca^{2+} -stimulated exocytosis. *Planta* 195, 305–308
- Thiel G, Sutter JU, Homann U** (2000) Ca^{2+} -sensitive and Ca^{2+} -insensitive exocytosis in maize coleoptile protoplasts. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 439, R152-R153
- Turner NC, a Jones MM** (1980) Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation. *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress (NC Turner and PJ Kramer, Editors)*, 87-103
- Uemura T, Yoshimura SH, Takeyasu K, Sato MH** (2002) Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes to Cells* 7, 743–753
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, Bohnert HJ, Pantoja O** (2004) Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiology* 135, 2318–2329
- Vogel SK, Petrasek Z, Heinemann F, Schwill P** (2012) Myosin motors fragment and compact membrane-bound actin filaments. *eLife* 2, e00116-e00116
- Wille A, Lucas W** (1984) Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. *Planta* 160, 129–42
- Wolfe J, and Steponkus PL** (1983) Mechanical properties of the plasma membrane of isolated protoplasts. *Plant Physiology* 71, 276–285
- Wolfe J, Dowgert MF, Steponkus PL** (1986) Mechanical study of the deformation of the plasma membranes of protoplasts during osmotic expansions. *Journal of Membrane Biology* 93, 63–74
- Yamada K, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2003) E64d, an inhibitor of papain family proteases, inhibits endocytosis and degradation of plasma membrane proteins in BY-2 cells and Arabidopsis root cells (poster abstract no. 1189). *In Plant Biology 2003*, July 25–30, 2003, Honolulu. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, <http://abstracts.aspb.org/pb2003/public/P69/0900.html>
- Zhang W, Fan LM, Wu WH** (2007) Osmo-sensitive and stretch-activated calcium-permeable channels in *Vicia faba* guard cells are regulated by actin dynamics. *Plant Physiology* 143, 1140–1151
- Zorec R, Tester M.** (1992) Cytoplasmic calcium stimulates exocytosis in a plant secretory cell. *Biophysical Journal* 63, 864–867